

**EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE CASPASA 3 ACTIVA EN CULTIVO ORGANOTÍPICO
AGUDO DE TAJADAS CEREBRALES DE RATA DERIVADAS DE UN MODELO DE
TRAUMA CRANEOENCEFÁLICO DIFUSO MODERADO**

**Tesis de grado para optar al título de:
MAGISTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Presentado por:
EINER MUÑOZ PINO**

**Director
EFRAÍN BURITICÁ RAMÍREZ
Profesor Asistente**

**CENTRO DE ESTUDIOS CEREBRALES
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS – FACULTAD DE SALUD
UNIVERSIDAD DEL VALLE
SANTIAGO DE CALI
2014**

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Olivia Pino y Ramon Muñoz, y mis hermanos, Maribel, German y Carlos, porque su constante apoyo e incondicional amor me hicieron una mejor persona, me permitieron soñar.

A los Doctores Matha Escobar y Hernán Pimienta, por permitirme ser parte de su grupo de investigación, darme la oportunidad de participar en este proyecto y por orientarme en el camino de las neurociencias.

Al Profesor Efraín Buriticá por enseñarme el buen quehacer investigativo, por su dedicación y entrega a mi formación y por su acompañamiento incesante durante todas las etapas de este proyecto.

Quisiera agradecer de manera muy especial a Carlos Arturo González, por sus consejos siempre oportunos, por enseñarme a valorar aún más las diferencias de pensamiento y por inculcarme el verdadero significado de la amistad.

También deseo hacer una mención especial a la Profesora Lina Vanessa Becerra, porque con su particular visión de las neurociencias me mostró que el verdadero análisis está más allá de cualquier fórmula o procedimiento estadístico.

A los Doctores Jaime Velasco, Gabriel Arteaga, Leonardo Fierro y Myriam Romero, por sus aportes a mi formación académica, pero sobre todo, por siempre creer en que es posible, y necesario, observar a la naturaleza desde perspectivas muy diferentes, lo que sin duda alguna me motivó a seguir adelante en el campo de las neurociencias.

A Nhora Holguín y Martha Lucia Ceballos, por la enorme paciencia que me tuvieron durante toda mi estadía en el laboratorio de neuroanatomía y por siempre haber estado dispuestas a enseñarme, aun sabiendo que yo no aprendía.

A las Profesoras Liliana Salazar y Carolina Pustovrh, por la colaboración que en más de una ocasión brindaron a este proyecto.

A mis compañeros del Centro de Estudios Cerebrales Carlos Guzmán, Gloria Aldana, Daniel Romero y Diana Gonzales, por sus explicaciones y apoyo en los procedimientos experimentales.

Finalmente agradezco a mis compañeros de estudio Dolly A., Jenniffer C., Esperanza S., Mildred S., Mariana R., Sonia O., Betty O., Eleonora T., Estefanía C., Franklin M., Silverio G., Olga G., Julian R., Alejandro R., Carlos V., Isaac A., Nelson V., Ricardo M., Beatriz M., Sebastian M., Juan J. (q.e.p.d.), Juan M., Juan S., Sarita C. y Betty T., por ser parte de este sueño.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 LESIÓN AXONAL DIFUSA.....	3
1.2 CULTIVOS ORGANOTÍPICOS AGUDOS.....	4
1.3 CASPASA 3 EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	5
1.4 NeuN.....	8
1.5 HOECHST.....	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 GENERAL.....	13
3.2 ESPECÍFICOS.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
4.1 BIOMODELOS.....	14
4.2 LESIÓN CEREBRAL EXPERIMENTAL.....	14
4.3 CULTIVO ORGANOTÍPICO AGUDO DE TAJADAS CEREBRALES.....	16
4.4 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO.....	17
4.5 CAPTURA Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.....	18
4.5.1 Deconvolución de las imágenes digitales.....	19
4.5.2 Cálculo de la inmunoreactividad.....	20
4.5.3 Estimación de la densidad para la IR tipo puntos.....	23
4.5.4 Estimación del tamaño nuclear.....	23

4.5.5 Co-localización.....	25
4.6 ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA.....	25
5. RESULTADOS.....	27
5.1 OBSERVACIONES CLÍNICAS.....	27
5.2 OBSERVACIONES HISTOPATOLÓGICAS MACROSCÓPICAS.....	27
5.3 RESULTADOS CUALITATIVOS.....	27
5.4 RESULTADOS CUANTITATIVOS.....	46
5.4.1 Inmunoreactividad en el hipocampo para Casp3 y NeuN.....	46
5.4.2 Área nuclear en el hipocampo.....	52
5.4.3 Área nuclear para la IR “tipo puntos” de Caspasa-3 en tiempo 0h.....	55
5.4.4 Densidad de células caspasa-3-positivas con IR “tipo puntos”.....	57
6. DISCUSIÓN.....	63
6.1 RESOLUCIÓN DE LA INMUNOFLUORESCENCIA PARA CASPASA 3.....	63
6.2 VULNERABILIDAD DIFERENCIAL EN EL HIPOCAMPO.....	64
6.2.1 Tejidos No cultivados.....	64
6.2.2 Tejidos en cultivo.....	67
6.3 VENTANA TEMPORAL PARA LA EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEBIDOS AL TRAUMA EN EL HIPOCAMPO (PERIODO DE VIABILIDAD HIPOCAMPAL EN CULTIVO).....	71
6.4 NATURALEZA DE LA IR TIPO PUNTOS.....	72
6.5 PÉRDIDA DE LA IR TIPO PUNTOS (VIABILIDAD DEL CULTIVO AGUDO).....	74
7. CONCLUSIONES.....	76
8. PERSPECTIVAS DEL PRESENTE TRABAJO.....	77
9. BIBLIOGRAFÍA.....	78

LISTA DE GRÁFICOS

Figura 4.1. Esquema del modelo de impacto-aceleración de Marmarou.....	14
Figura 4.2. Cámara de cultivo organotípico agudo modificada de Krimer y Goldman-Rakic...	16
Figura 4.3. Cálculo de la IR por valor de pixel para NeuN en una sección del giro dentado...	22
Figura 4.4. Conteo celular para la estimación de la densidad de la IR tipo puntos.....	24
Figura 4.5. Delineación de perímetros nucleares para la estimación del tamaño nuclear.....	24
Figura 5.1. Trauma 0h cultivo. Inmunoreactividad para Casp3 “tipo puntos” y “tipo neurona”.....	33
Figura 5.2. Trauma 0h cultivo. Marcación nuclear de Casp3.....	34
Figura 5.3. Trauma 0h cultivo. Marcación nuclear de Casp3 en cuerpo calloso.....	34
Figura 5.4. Trauma 0h cultivo. Co-localización Casp3 y NeuN para IR tipo puntos.....	35
Figura 5.5. Trauma 0h cultivo. Co-localización Casp3 y NeuN en hipocampo.....	36
Figura 5.6. Trauma 0h cultivo. IR tipo neurona en regiones diferentes al hipocampo.....	37
Figura 5.7. Control 0h cultivo. Inmunorreactividad para Casp3 “tipo puntos” y “tipo neurona”.....	38
Figura 5.8. Control 0h cultivo. Marcación nuclear de Casp3.....	39
Figura 5.9. Control 0h cultivo. Co-localización Casp3 y NeuN.....	40
Figura 5.10. Características de la IR tipo puntos e IR tipo neurona a lo largo del cultivo...	41-42
Figura 5.11. IR tipo neurona en sectores diferentes al hipocampo a lo largo del cultivo.....	43
Figura 5.12. Cambios en la marcación de Casp3 a lo largo del cultivo.....	44-45
Figura 5.13. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia empleada en el cálculo de la inmunorreactividad en el hipocampo.....	47
Figura 5.14. Inmunorreactividad, por densidad óptica relativa, para Casp3 en la capa piramidal y granular del hipocampo.....	49
Figura 5.15. Diagramas de dispersión para la Casp3-IR entre las áreas del hipocampo con mayor similitud en su dinámica.....	50

Figura 5.16. Inmunorreactividad, por valor de pixel, para NeuN en la capa piramidal y granular del hipocampo.....	52
Figura 5.17. Tamaño nuclear, medido como área nuclear planimétrica, en la capa piramidal y granular del hipocampo.....	54
Figura 5.18. Comparación de la evolución del tamaño nuclear en las capas piramidales de CA2 y CA3 para las muestras con trauma.....	55
Figura 5.19. Tamaño nuclear, medido como área nuclear planimétrica, de las células con caspasa3-IR tipo puntos para las 0h de cultivo.....	56
Figura 5.20. Tamaño nuclear, medido como área nuclear planimétrica, de las células con caspasa3-IR tipo puntos, comparando Trauma vs. Control para las 0h de cultivo.....	57
Figura 5.21. Densidad de las células caspase-3 positivas con IR tipo puntos.....	60-62

LISTA DE TABLAS

Tabla 4.1 Parámetros empleados en el modelo de Born & Wolf para la estimación teórica de la PSF.....	20
Tabla 5.1. Matriz de coeficientes de correlación para los valores promedio de Casp3-IR en el hipocampo.....	50

RESUMEN

El trauma craneoencefálico (TCE) es un problema de salud pública que aqueja a la población mundial afectando la calidad de vida tanto de quienes lo padecen como de su familiares debido a las secuelas físicas, cognitivas y emocionales, sin mencionar los altos costos socioeconómicos implicados. Un componente muy importante del TCE es la lesión axonal difusa (DAI, por sus siglas en inglés), considerada clínicamente más devastadora que el componente de lesión focal ya que frecuentemente conduce a desórdenes neurológicos que pueden perdurar a lo largo de la vida del paciente. En un esfuerzo por comprender mejor la fisiopatología de la lesión axonal difusa, y con el ánimo de identificar posibles terapias farmacológicas en periodos tempranos post-lesión, el Centro de Estudios Cerebrales se ha dado a la tarea de diseñar un modelo de cultivo organotípico agudo de cerebros de rata en las que se ha inducido la DAI empleando una versión modificada del modelo de impacto-aceleración por caída libre de Marmarou.

Como parte de las evaluaciones preliminares del modelo, en este proyecto se valoraron cuantitativamente los niveles de caspasa 3 clivada (Casp3) en los tejidos lesionados, para periodos de cultivo de 2, 4 y 6 horas. Empleando como herramienta principal la inmunofluorescencia se detectaron dos tipos de marcación para Casp3 a las que denominamos IR tipo neurona, por co-localizar con NeuN, e IR tipo puntos, que no co-localizó con NeuN. Ambas marcaciones fueron principalmente nucleares, estando la IR tipo puntos asociada a núcleos circulares y de menor tamaño que los de la IR tipo Neurona. También se hicieron medidas de áreas nucleares sobre tinción de Hoechst como apoyo en la interpretación de los resultados.

La IR tipo neurona permitió identificar al Hipocampo como la región con alteraciones determinadas por la marcación con Casp3. Los sectores más vulnerables a la DAI fueron CA1 y el giro dentado. Por su parte CA2 mostró ser el sector más resistente a la DAI y al cultivo, sin incrementos significativos en los niveles de Casp3 como respuesta a estos dos tipos de injuria. No obstante, CA2 junto con el giro dentado, mostraron niveles altos de Casp3 en los controles de los tejidos no cultivados, lo que estaría indicando que algún factor ajeno a la DAI y al cultivo está actuando también sobre estas dos regiones.

La IR tipo puntos se identificó tanto en los tejidos traumatizados como en los controles con una amplia distribución espacial. Su pérdida paulatina conforme aumentó el tiempo de cultivo permitió establecer que la deficiencia en el transporte de gases y líquido cefalorraquídeo artificial es la principal limitante de la longevidad de los tejidos en cultivo.

De los análisis conjuntos para las marcaciones de Casp3 y NeuN se pudo establecer que el periodo de viabilidad de las tajadas en cultivo es de 2 horas. Adicionalmente este es el tiempo en el que se puede seguir la evolución del trauma de forma diferencial respecto a los controles, al menos en lo que respecta a la expresión de Casp3 en el hipocampo.

Palabras clave: Caspasa 3, Cultivo Organotípico Agudo, Lesión Axonal Difusa, Cerebro de Rata

ABSTRACT

Traumatic brain injury (TBI) is a significant public healthcare burden in worldwide impacting the patient's quality of life and their family members because of physical, cognitive and emotional sequelae, not to mention the socioeconomic implications. Diffuse axonal injury (DAI) is an important component of TBI and it is considered clinically more devastating than focal injury, tending to result in long-term neurological impairments. In an effort to get a better understanding of the pathophysiology of diffuse axonal injury, and with the aim of identifying potential drug therapies in early periods post-injury, the Centro de Estudios Cerebrales is designing a model of acute organotypic rat brain culture with rats subject to a modified version of the Marmarou impact-acceleration weight-drop injury model for DAI induction.

As part of the preliminary assessment of the model, in this project the levels of cleaved caspase 3 (Casp3) were quantitatively assessed the response to injury, for culture periods of 2, 4 and 6 hours. Using immunofluorescence as a principal tool two types of Casp3 labeling were detected, which we called IR like-neuron, which co-localized with NeuN, and IR like-points, which did not co-localize with NeuN. Both labeling patterns were primarily nuclear, being IR like-points associated with rounded and smaller nuclei than IR like-neuron. In addition, nuclear area was measured on Hoechst staining as a support in the interpretation of the results.

IR like-neuron allowed us to identify the hippocampus as the region most likely to be assessed quantitatively to changes in Casp3 in response to injury and culture. The most vulnerable areas to DAI were CA1 and dentate gyrus. On the other hand, CA2 was the most resistant region against DAI and culture, without significant increases in the levels of Casp3 in response to these types of insults. However, CA2 and dentate gyrus showed high levels of Casp3 in non-cultivated controls, suggesting that some factor beyond the DAI and culture is acting on these two regions.

IR like-points was identified on trauma as well as on controls with a broad spatial distribution. Its gradual lost during culture allows establishing the impairment of gases and artificial cerebrospinal fluid transport as the main limiting factor in the longevity of the tissue cultures.

Taking into consideration the labeling for Casp3 and NeuN it was possible to determine 2 hours of culturing as the viability time of slices. Moreover, within this time the evolution of trauma can be distinguished from control, at least regarding Casp3 expression in hippocampus.

Palabras clave: Caspase 3, Acute Organotypic Culture, Diffuse Axonal Injury, Rat Brain

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LESIÓN AXONAL DIFUSA

El trauma craneoencefálico (TCE) se origina a partir de esfuerzos mecánicos excesivos con la capacidad de generar deformaciones que sobrepasan los umbrales estructurales y funcionales del tejido nervioso, conduciendo a fallas mecánicas tanto macroscópicas como microscópicas acompañadas de diversas respuestas celulares y de una alteración funcional. El umbral de lesión depende tanto de los valores de aceleración de la cabeza como de la duración de esta aceleración. Sin embargo, el tipo de aceleración, lineal o angular, y el plano donde la aceleración es inducida, probablemente juegan un papel importante en el daño del tejido. Se ha demostrado que las aceleraciones angulares son particularmente nocivas en el tejido nervioso (Ommaya & Gennareli, 1974); estas aceleraciones producen deformaciones por cortante, las más preponderantes en el TCE (Holbourn, 1943), que correlacionan con una alta probabilidad de inicio de conmoción cerebral y de daño tisular como la lesión axonal difusa (DAI) (Gennareli *et al.*, 1972; King *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006). Aunque denominada “difusa”, el patrón de daño axonal en la sustancia blanca es más exactamente descrito como multi-focal, apareciendo a través de la sustancia blanca subcortical y profunda, y siendo particularmente común en estructuras de la línea media, incluyendo el esplenio del cuerpo calloso. Se considera que la DAI contribuye significativamente a la disfunción neurocognitiva post-trauma, con secuelas a largo plazo (Lipton *et al.*, 2008; Niogi *et al.*, 2008; Browne *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2013; Kou & VandeVord, 2014).

En la DAI leve a moderada, frecuentemente hay una notable ausencia de patología macroscópica y los cerebros pueden parecer normales ante los exámenes radiológicos (Jane *et al.*, 1985; Mittl *et al.*, 1994). No obstante, la examinación microscópica del tejido cerebral revela la distinción patológica de la DAI, axones hinchados y desconectados. En la DAI severa, la patología axonal está acompañada por rasgaduras del tejido en la sustancia blanca con hemorragia intraparenquimal usualmente localizada centralmente en el cuerpo del cuerpo calloso, los ganglios de la base, y la región dorsolateral del tallo cerebral rostral. Este nivel de DAI se asocia con inconsciencia prolongada, alta mortalidad, y una pobre recuperación en los sobrevivientes (Ommaya & Gennarelli, 1974; Gennarelli, 1992).

Se ha sugerido que en la DAI existen dos procesos diferentes de daño axonal (Farkas & Povlishock, 2007). El primero se caracteriza por una alteración focal de la permeabilidad del axolema que conlleva a un incremento local de calcio y a edema mitocondrial. Tanto la desregulación local de calcio como la liberación de citocromo c de la mitocondria dañada ocasionan la activación de cisteinil-proteasas y la subsiguiente alteración de elementos esenciales del citoesqueleto axonal incluyendo la pérdida de microtúbulos y la compactación de neurofilamentos como consecuencia del clivaje de sus brazos laterales. Lo anterior impide el transporte axonal normal, sin embargo, no hay cese de este transporte ni tampoco edema axonal. Se ha sugerido que se presenta una conversión del transporte anterógrado en

retrogrado previniéndose así el edema axonal. El segundo tipo de lesión axonal se caracteriza por una combinación de edema axonal local y alteración del transporte axonal pero no por una alteración pronunciada de la permeabilidad del axolema. Se ha sugerido que con este tipo de lesión puede haber alteraciones sutiles en la permeabilidad de la membrana que desencadenan la activación de la calcineurina. La calcineurina a su vez altera la red de microtúbulos, perturbando el transporte axonal, lo que ocasiona la acumulación de organelas y el edema. Posterior a la desconexión, que puede ocurrir después de ambos tipos de lesión, el axón experimenta un proceso de degeneración Walleriana consistente en la ruptura de la cubierta de mielina y del cilindro axónico. El sitio diana que ha perdido su entrada desde el axón desconectado puede experimentar reorganización sináptica, por ejemplo a través del brote axónico de fibras intactas vecinas. Este proceso de reorganización sináptica puede ser adaptativo o mal-adaptativo.

1.2 CULTIVOS ORGANOTÍPICOS AGUDOS

Las preparaciones *in vitro* de tajadas cerebrales se han convertido en una aproximación experimental muy útil y aceptada en el campo de las neurociencias. De hecho mucho de nuestro entendimiento de la función neuronal a nivel sináptico y celular se deriva de esta aproximación. Sus usos abarcan un amplio espectro dentro de las neurociencias, incluyendo la inmunohistoquímica, la neuroanatomía, estudios farmacológicos y biomoleculares para la investigación de canalopatías, y estudios electrofisiológicos para caracterizar las propiedades de las sinapsis y neuronas individuales, junto con la glía y las redes neuronales (Colbert, 2006; Buskila *et al.*, 2007; Buskila & Amitai, 2010; Khurana & Li, 2013). Las preparaciones *in vitro* de tajadas cerebrales proveen una manera de examinar parámetros metabólicos y propiedades electrofisiológicas sin contaminación de anestésicos, relajantes musculares o sustancias regulatorias intrínsecas. Los rápidos tiempos de preparación adicionalmente evitan el uso prolongado de anestésicos. El hecho de que las tajadas mantienen su integridad estructural, a diferencia de los cultivos celulares, permite el estudio de circuitos específicos y de redes cerebrales de manera aislada (Colbert, 2006; Luhmann & Kilb, 2012). La estabilidad de los registros electrofisiológicos en las tajadas agudas es superior a los registros *in vivo* puesto que los latidos del corazón y la respiración de los biomodelos son eliminados, lo que también permite periodos más largos de registros celulares. Adicionalmente, la visualización directa de las tajadas permite a los investigadores localizar, identificar y acceder fácilmente a las células bajo estudio (Gibb & Edwards, 1994) y también permite la aplicación local de fármacos, que de otra manera serían bloqueados por la barrera hematoencefálica.

A pesar de las ventajas citadas, los cultivos organotípicos agudos tienen una serie de limitaciones que restringen su uso. Una de las mayores limitaciones es el tiempo de vida de las tajadas cerebrales, pues esto restringe el tiempo disponible para estudiar las propiedades neuronales de las tajadas. Normalmente, el tiempo de vida de una tajada cerebral, bien sea de rata o ratón, es de 6-12 horas. Además, se ha reportado que la gran mayoría de células en

tajadas delgadas neocorticales e hipocampales solo pueden mantenerse en estado saludable por alrededor de 4 horas (Fukuda *et al.*, 1995). Para el caso de tejido traumatizado el Centro de Estudios Cerebrales ha reportado previamente el mantenimiento en buenas condiciones de tejido contuso humano hasta por 2 horas, constituyéndose esto en una de las primeras evidencias de que este tipo de tejido es sostenible *in vitro* (Riascos, 2007).

Las principales razones para el lapso de vida tan corto de las tajadas en cultivo agudo pueden ser divididas en dos categorías principales: propiedades externas y propiedades internas. Las propiedades externas que pueden disminuir la viabilidad celular en las tajadas incluyen cambios en el pH, la temperatura, el oxígeno y los niveles de glucosa (Dingledine *et al.*, 1988; Reid *et al.*, 1988; Schurr *et al.*, 1995). Adicionalmente, como las tajadas típicamente se mantienen en un ambiente no esteril, estas son vulnerables al crecimiento de bacterias que liberan endotoxinas como lipopolisacáridos, que conducen a la neurodegeneración impactando la supervivencia celular (Ahmed *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2007). El uso de antibióticos se puede emplear para reducir los niveles de bacterias, sin embargo la adición de antibióticos representa un problema pues se ha demostrado que muchos de ellos activan neuronas (Grøndahl & Langmoen, 1993), produciendo un impacto sobre la fisiología celular que potencialmente puede sesgar los resultados experimentales. Las propiedades internas incluyen el deterioro del tejido debido a procesos de lesión secundaria que siguen al daño causado por el procedimiento de corte de las tajadas. Sustancias tóxicas como los aminoácidos excitatorios liberados desde las células lesionadas durante el procedimiento de corte conducen a la excitotoxicidad y a la vulnerabilidad neuronal (Schurr *et al.*, 1995). Otra propiedad que podría considerarse interna se refiere al grosor de las tajadas. En tajadas gruesas se produce un decaimiento metabólico como consecuencia del suministro limitado por difusión de oxígeno y glucosa, lo que lleva al rápido deterioro del tejido, sobre todo en regiones alejadas de sus superficies (Rambani *et al.*, 2009).

1.3 CASPASA 3 EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Las caspasas (cisteinil-proteasas específicas de aspartato) son una familia de enzimas altamente reguladas involucradas en diversos mecanismos celulares, entre ellos la remodelación, diferenciación, inflamación y la muerte programada. La estructura primaria de una caspasa consiste en un pro-dominio amino-terminal y un dominio proteasa carboxilo-terminal que contiene el residuo de cisteína catalítico; el dominio proteasa está compuesto por una subunidad grande y una subunidad pequeña. Las caspasas se sintetizan como pro-enzimas que luego son procesadas proteolíticamente, sobre residuos críticos de aspartato, hacia su forma activa; este procesamiento remueve el pro-dominio y separa las subunidades grande y pequeña. Todas las especies activas de caspasa que se conocen son tetrámeros con dos subunidades grandes, dos pequeñas, y dos sitios activos idénticos (Crawford & Wells, 2011). Se considera que la activación de las caspasas es esencial en la apoptosis, tanto así que usualmente se adjudica a esta forma de muerte programada su rol

preponderante (Lockshin & Zakeri, 2004). Las caspasas apoptóticas se clasifican en dos grupos según su posición en las cascadas de señalización. Las caspasas iniciadoras (caspasa 2, 8, 9 y 10) que tienen pro-dominios largos y son activadas por proximidad inducida; y cuando estos pro-dominios interactúan con las proteínas adaptadoras, promueven la dimerización de las caspasas. Las caspasas ejecutoras (caspasa 3, 6 y 7) tienen pro-dominios cortos y existen en la célula como homodímeros preformados pero inactivos; después de su clivaje, mediado por una caspasa iniciadora, las caspasas ejecutoras actúan sobre substratos celulares específicos para dismantelar la célula (Parrish *et al.*, 2013).

La caspasa 3 existe como pro-enzima de 32 kDa, la forma activa de la enzima es un complejo tetramérico compuesto de dos subunidades de 17 kDa y dos de 12 kDa (Nicholson *et al.*, 1995). La caspasa 3 es activada como consecuencia de la liberación de citocromo c desde la mitocondria hacia el citosol, lo que induce la formación del apoptosoma, un complejo macromolecular que contiene al factor de activación de la apoptosis (Apaf1). Una vez el apoptosoma se forma, recluta a la pro-caspasa 9 vía interacciones con el dominio de reclusión de caspasa (CARD), involucrando el extremo N-terminal CARD de Apaf1. Este actúa como motivo de enganche para la pro-caspasa 9, y el complejo Apaf1-caspasa 9-apoptosoma entonces eficientemente recluta y cliva a la pro-caspasa 3. En el SNC la caspasa 3 es considerada como la principal efectora de las cascadas apoptóticas (Davoli *et al.*, 2002; Salvesen, 2002; D'Amelio *et al.*, 2012). Las dos principales rutas de señalización apoptótica, la extrínseca o ruta de receptores de muerte (Schulze-Osthoff *et al.*, 1998) y la intrínseca o mitocondrial (Green & Kroemer, 2004) convergen en la activación de caspasa 3. Adicionalmente, en las neuronas se ha comprobado que la ruta extrínseca y la ruta intrínseca no son mutuamente excluyentes y pueden interactuar entre ellas (Ashe & Berry, 2003); en este caso la ruta mitocondrial es reclutada a través del clivaje mediado por caspasa 8 de Bid, un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2. Una vez clivado, la versión truncada de Bid (tBid) se transloca a la mitocondria, donde induce la liberación de citocromo c, paso fundamental en la ruta mitocondrial (Katz *et al.*, 2012).

La apoptosis mediada por caspasa 3 juega un rol esencial en el esculpido y el remodelamiento de las redes neuronales del SNC. Se estima que aproximadamente la mitad de la población celular producida durante el desarrollo del sistema nervioso es eliminada por apoptosis para optimizar las conexiones sinápticas y remover las neuronas innecesarias. En el neurodesarrollo la apoptosis se observa temprano en la formación del tubo neural y persiste durante la diferenciación terminal de las redes neurales, involucrando neuronas, glía y células progenitoras neurales. En esta etapa es posible identificar dos diferentes tipos de muerte celular: muerte de células progenitoras neurales (CPNs) y muerte de neuronas postmitóticas; la privación de morfógenos induce apoptosis en las CPNs, mientras que la privación de neurotrofinas lo hace en las neuronas postmitóticas. Aunque estos tipos de muerte celular son regulados por diferentes estímulos e involucran diferentes moléculas pro- y anti-apoptóticas en rutas específicas de las diferentes etapas del desarrollo, el rol de caspasa 3 en la apoptosis se mantiene esencial durante todas estas etapas en el CNS (D'Amelio *et al.*, 2010; 2012).

Se suele especular que un importante componente de la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas es debida a apoptosis, sin embargo este es un tema muy debatido dada la dificultad en la identificación de células con morfología apoptótica típica en algunas de estas enfermedades (Becerra & Pimienta, 2009). Adicionalmente, en las enfermedades de Parkinson y Alzheimer no se ha demostrado hasta qué punto podría ocurrir la muerte mediada por caspasas (X Sureda *et al.*, 2011). Así pues, por el momento, no parece existir alguna prueba convincente que atribuya a la caspasa 3 un papel esencial en la fase terminal de las neuronas en enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, lo anterior contrasta con la evidencia experimental que muestra que la actividad de la caspasa 3 podría contribuir a la neurodegeneración, al menos en etapas iniciales, mediante la producción de fragmentos proteicos tóxicos propensos a formar agregados, actuando por ejemplo sobre la proteína Huntingtina, la Tau, y la Presenilina 2; y también por la estimulación de señalización nociva para la función neuronal, por ejemplo procesando proteolíticamente proteínas como APP, Presenilina 1 y GGA3, lo cual potenciaría la generación de fragmentos Beta Amiloide (D'Amelio *et al.*, 2012). Adicionalmente, en modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer en ratones, se ha corroborado que el clivaje mediado por caspasa 3 de la quinasa Akt y la fosfatasa calcineurina, promueve la internalización de receptores AMPA desde los sitios sinápticos, lo cual conlleva a la atrofia progresiva de espinas dendríticas y por ende de la función sináptica en las neuronas afectadas (D'Amelio *et al.*, 2011; Jo *et al.*, 2011). La alteración de espinas dendríticas es una característica de muchas enfermedades neurodegenerativas, particularmente de aquellas que involucran disfunción cognitiva, como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, y adicionalmente es una característica encontrada en otros trastornos como el autismo, el síndrome de Down, la adicción a drogas, el síndrome del X frágil y la esquizofrenia (Yu & Lu, 2012). No obstante, el posible rol de la caspasa 3 en la pérdida de espinas dendríticas en enfermedades diferentes al Alzheimer aún debe ser investigado.

Se debe tener presente que la actividad de la caspasa 3 en el CNS no solo está implicada en procesos de muerte celular o neurodegeneración, sino también en funciones fisiológicas como la diferenciación celular, la plasticidad sináptica, el podado dendrítico y procesos de aprendizaje y memoria. Algunas funciones no apoptóticas que incluyen la activación de microglia, la gliosis, la plasticidad dendrítica y la neurogénesis, también se han reportado en respuesta a la lesión experimental (Tzeng *et al.*, 2013). En estos casos se considera que debe existir un control muy fino de la actividad de caspasa 3 que permita mantener estas actividades sin relación con la muerte o la degeneración.

Investigaciones empleando diversos modelos de trauma craneoencefálico, tanto *in vitro* como *in vivo*, han corroborado que la activación de caspasa 3 en este tipo de lesión cerebral es un hecho predominante (Pineda *et al.*, 2004; Raghupathi, 2004). En uno de los primeros estudios al respecto, Yakovlev y colaboradores (Yakovlev *et al.*, 1997) haciendo uso de un modelo de percusión lateral por fluido en ratas, determinaron mediante métodos *in vivo* e *in vitro*, que en la corteza ipsilateral se producía un aumento significativo, tanto de los niveles de RNAm como de la actividad enzimática de caspasa 3. En la corteza parieto-temporal estos aumentos

se reportaron a partir de 1 h post-trauma para la actividad enzimática y después de 4 h post-trauma para los niveles de RNAm. En el hipocampo los niveles de RNAm incrementaron a las 24 h post-trauma, sin embargo no se reportaron cambios en la actividad enzimática de caspasa 3. La anterior información, junto con análisis de electroforesis en gel de ADN y de datos histológicos obtenidos por triple marcaje TUNEL-NeuN-Hoechst, permitió a los autores concluir que la apoptosis juega un importante rol patofisiológico en la pérdida neuronal post-traumática. La misma conclusión emerge de un modelo similar de trauma craneoencefálico (Keane *et al.*, 2001) en donde, entre otros análisis, se correlacionó la marcación de caspasa 3 clivada, su conformación activa, con la identificación de cuerpos apoptóticos en la corteza cerebral, el hipocampo y el tálamo. En ambos estudios la activación de caspasa 3 se detectó a partir de 1 h post-trauma en la corteza cerebral y en tiempos posteriores en el hipocampo. Investigaciones empleando el modelo de impacto cortical controlado en rata (Beer *et al.*, 2000; Clark *et al.*, 2000) también reportan la activación ipsilateral de caspasa 3 desde las primeras horas hasta días después del trauma, correlacionando dicha actividad con rasgos de muerte celular. Sin embargo, en ocasiones no existe evidencia en estos biomodelos de la activación de caspasa 3 en el hipocampo (Beer *et al.*, 2000). Los anteriores estudios experimentales concuerdan en términos generales con análisis de tejido contuso humano obtenido por cirugía decompresiva en pacientes con trauma craneoencefálico (Clark *et al.*, 1999), así como con análisis de productos del clivaje de caspasa 3 en líquido cefalorraquídeo de estos pacientes (Farkas *et al.*, 2005). Casos en los que también se argumenta la ocurrencia de muerte celular programada en concomitancia con la activación de caspasa 3. En modelos experimentales de lesión axonal difusa también se reporta la activación de caspasa 3. En estos casos la distribución de la marcación suele ser amplia incluyendo la corteza, el hipocampo, el tallo cerebral y la sustancia blanca subcortical y profunda. Los periodos de expresión pico parecen depender de las características del modelo pero en general se reporta el inicio de la actividad de caspasa 3 dentro de las primeras 24 horas post-trauma (Büki *et al.*, 2000; Cernak *et al.*, 2002, 2004; Zhao *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013).

1.4 NeuN

El antígeno nuclear neuronal NeuN es una proteína específica que se expresa en el núcleo y citoplasma de neuronas post-mitóticas maduras (Mullen *et al.*, 1992; Sarnat *et al.*, 1998). Su correspondiente anticuerpo, desarrollado por Mullen en 1992 (Mullen *et al.*, 1992), reconoce NeuN principalmente en el núcleo, pero también son inmunorreactivos, aunque en menor medida, el soma y los procesos proximales. La gran mayoría de neuronas son positivas para NeuN, sin embargo existen algunas excepciones como las células de Cajal-Retzius, las células de Purkinje, las neuronas del núcleo dentado en el cerebelo, las neuronas del núcleo olivar inferior en el bulbo raquídeo, las neuronas fotorreceptoras retinianas, las células mitrales del bulbo olfatorio, las células de la cadena ganglionar simpática y las interneuronas cerebelosas, las cuales comprenden a las células en cesta, las células estrelladas, las células de Golgi, las células unipolares en forma de brocha y las células de Lugaro; tampoco

ningún tipo de célula glial presenta inmunorreactividad para este marcador (Mullen *et al.*, 1992; Sarnat *et al.*, 1998; Weyer & Schilling, 2003).

NeuN comprende dos isoformas de aproximadamente 46 y 48 kDa (Mullen *et al.*, 1992) con múltiples sitios para ser fosforiladas (Lind *et al.*, 2005). La unión del anticuerpo que lo identifica depende del estado de fosforilación. La isoforma de 48 kDa es predominante en el citoplasma. Por más de quince años se sugirió que NeuN podría corresponder a un factor transcripcional, finalmente, Kim y colaboradores (Kim *et al.*, 2009) demostraron que NeuN es Fox-3, una proteína involucrada en la regulación del empalme alternativo del RNA mensajero. Fox-3 contiene un motivo de reconocimiento de RNA en la parte media de la molécula y es muy probable que se una específicamente al elemento UGCAUG. Este elemento está sobre representado en los intrones en los que el empalme es regulado de una manera dependiente del tipo celular y de la etapa de desarrollo, en comparación con los intrones empalmados constitutivamente. Por lo tanto, Fox-3 podría actuar como un factor determinante de la especificidad neuronal durante el empalme, sugiriéndose así un posible rol de esta molécula en la diferenciación de células neurales y en el desarrollo del sistema nervioso (Kim *et al.*, 2009).

A pesar de que NeuN sea considerado un buen marcador neuronal, dada su amplia especificidad para la mayoría de los tipos de células neuronales y su reactividad cruzada con múltiples especies, se debe tener presente que no siempre este es el caso. Al respecto se ha reportado, por ejemplo, el uso poco confiable de este marcador para las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra parte compacta en rata (Cannon & Greenamyre, 2009). También se ha demostrado que existe diferencia entre especies para la marcación de NeuN; en el Gerbil, una subfamilia de roedores de la familia Muridae, las neuronas GABAérgicas de la sustancia negra parte reticulada no muestran inmunorreactividad al antígeno (Kumar & Buckmaster, 2007). No obstante lo anterior, en lo que respecta a la corteza cerebral se cree que NeuN marca fielmente a la población neuronal, y por tal motivo es considerado el mejor marcador para diversos estudios en esta estructura (ver por ejemplo: Gittins & Harrison, 2004; Lyck *et al.*, 2008; Sahara *et al.*, 2012).

Las neuronas sanas presentan una intensa marcación para NeuN, es por ello que una disminución en esta marcación se suele aceptar como indicativo de degeneración. De hecho, se ha reportado que la inmunorreactividad para NeuN decrece ante muchas condiciones patológicas, entre ellas isquemia cerebral-hipoxia (Schmidt-Kastner *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2002; Arango-Dávila *et al.*, 2004), patologías inflamatorias (Hoffman *et al.*, 2001), hemorragia subaracnoidea (Sabri *et al.*, 2008), micro-infartos (Wang *et al.*, 2012), epilepsia del lóbulo temporal (Tzeng *et al.*, 2013) y trauma craneoencefálico (Carbonell & Grady, 1999; Knoblach *et al.*, 2004; Manley *et al.*, 2006; Escobar *et al.*, 2008; Riascos *et al.*, 2008). La pérdida total de inmunorreactividad para NeuN es comúnmente asociada a pérdida celular (Dawodu & Thom 2005; Tippet *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012), sin embargo, algunos autores sostienen que esta asociación no se puede establecer de forma directa. Al respecto se ha reportado la ausencia de rasgos morfológicos distintivos de muerte celular en neuronas NeuN negativas

(Ünal-Çevik *et al.*, 2004; Lavezzi *et al.*, 2013), e incluso la pérdida de marcación reversible con recuperación antigénica (Ünal-Çevik *et al.*, 2004). En estos casos se ha sugerido que la pérdida de inmunorreactividad podría estar relacionada con cambios en la antigenicidad o quizá con una reducción en la síntesis de NeuN. Por su parte, varios autores han demostrado que la inmunorreactividad negativa para NeuN correlaciona con muerte celular, en algunos casos empleando el ensayo de TUNEL para establecer esta relación (Hoffman *et al.*, 2001; Davoli *et al.*, 2002); también por la correlación de rasgos morfológicos de muerte celular (Vereczki *et al.*, 2006) y de la pérdida de neuronas teñidas con Nissl (Riascos *et al.*, 2013) con áreas NeuN negativas de la corteza cerebral.

1.5 HOECHST

Hoechst, compuestos derivados bis-benzimidazol, son una familia de colorantes fluorescentes supravitales de ácidos nucleicos permeables a las membranas celulares. Entre sus múltiples aplicaciones están la detección sensible de ADN en presencia de ARN en geles de agarosa, la determinación automatizada de ADN, el conteo celular, la identificación de estructuras anatómicas, estudios de reparación, replicación y estructura cromosómica, entre otros. En microscopia de fluorescencia se emplean principalmente como marcadores nucleares. Estos colorantes se une al surco menor del ADN, y aunque se puede unir a todos los ácidos nucleicos, la unión a cadenas ricas en AT es preferencial e incrementa la fluorescencia en aproximadamente dos órdenes de magnitud en comparación con las cadenas ricas en GC. Hoechst 33258 y Hoechst 33342, los colorantes de mayor uso en la actualidad, presentan un pico de máxima absorción en luz ultravioleta alrededor de los 352 nm, y un pico de máxima emisión en luz fluorescente azul alrededor de los 455nm. Hoechst 33258, por contener un hidroxilo terminal, es ligeramente más soluble en agua que Hoechst 33342, quien en cambio posee un grupo etilo. Dada su mayor hidrofobicidad, Hoechst 33342 puede penetrar más fácil las membranas celulares que Hoechst 33258. Ambos marcadores exhiben muy débil fluorescencia en solución a pH 7, pero una muy fuerte fluorescencia cuando se unen al ADN (Latt *et al.*, 1975; Latt & Stetten, 1976; Molecular Probes, 2005).

Hoechst es una herramienta útil en estudios de muerte celular debido a la propiedad de suministrar información acerca de la morfología nuclear. Se le suele emplear para discriminar cuantitativamente una de las secuelas clásicas de la apoptosis, la condensación nuclear (Lo *et al.*, 1995; Daniel & DeCoster, 2004; Krysko *et al.*, 2008; DeCoster *et al.*, 2010; Joshi *et al.*, 2012; Berghe *et al.*, 2013). También, junto con otros marcadores, puede ser usado en la identificación de necrosis y muerte celular por autofagia. Estos usos abarcan tanto las técnicas de inmunocitofluorescencia (Tasdemir *et al.*, 2008; Hubbard *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013), como de inmunohistofluorescencia (Whiteside & Munglani, 1998).

En estudios de lesión cerebral la tinción con Hoechst permite hacer un seguimiento a las neuronas que exhiben una morfología nuclear apoptótica, caracterizada por núcleos picnóticos y/o fragmentados con contenido de cromatina condensada. En algunos de estos

estudios el análisis de la marcación de Hoechst se constituye en la principal herramienta para la identificación de células apoptóticas (Galehdar *et al.*, 2010), en otros su uso es complementario para técnicas como TUNEL (Yakovlev *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2012).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los cultivos organotípicos agudos representan una herramienta experimental valiosa en el estudio de fármacos neuroprotectores en trauma craneoencefálico (TCE). En estos cultivos, excluidos de barrera hematoencefálica, los patrones de conexiones sinápticas dentro de las tajadas están mínimamente alterados con respecto a los patrones *in vivo* al momento de la extracción, lo que abre la posibilidad a una evaluación futura directa de los efectos de fármacos sobre mecanismos fisiopatológicos que podrían reflejar aquellos desarrollados *in situ*.

Nuestro grupo de investigación ha cultivado con éxito tejido contuso humano hasta por 2 horas, abriendo la posibilidad para el desarrollo de modelos de cultivo agudo con la capacidad de preservar tejido traumatizado, lo que se constituiría en una gran herramienta en el estudio del TCE. Motivados por estos resultados previos el Centro de Estudios Cerebrales se ha propuesto desarrollar un modelo de cultivo organotípico agudo de cerebro de rata para la futura evaluación de medicamentos neuroprotectores. Como parte de las evaluaciones preliminares del modelo se hace necesaria la caracterización cuantitativa, por seguimiento de elementos moleculares claves, de mecanismos de degeneración en el cultivo, con el propósito de determinar posibles referencias sobre las cuales comparar los efectos de los medicamentos. Dentro de estos mecanismos se encuentra la inducción de procesos apoptóticos, donde la caspasa 3 activa desempeña un rol protagónico.

Considerando lo anterior el presente proyecto pretende conocer cómo es la respuesta, en términos de niveles de caspasa 3 activa, en un cultivo organotípico agudo de cerebros de rata sometidas a un trauma craneoencefálico difuso moderado, caracterizando cuantitativamente la o las regiones del tejido más vulnerables, es decir, donde esta respuesta es más pronunciada.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Describir cuantitativamente los cambios temporales y espaciales más pronunciados en la expresión inmunohistoquímica de la proteína caspasa 3 clivada en un modelo de cultivo organotípico agudo de cortes cerebrales de rata derivados de trauma craneoencefálico difuso moderado.

3.2 ESPECÍFICOS

- Realizar una descripción cualitativa de los cambios temporales y espaciales para caspasa 3 clivada con el propósito de determinar aquellos más susceptibles de ser cuantificados en un modelo de cultivo organotípico agudo de cortes cerebrales de rata derivados de trauma craneoencefálico difuso moderado.
- Establecer comparaciones estadísticas para los niveles de la proteína caspasa 3 clivada entre tejido traumatizado y tejido control durante los diferentes periodos del cultivo agudo.
- Establecer comparaciones estadísticas entre los niveles de la proteína caspasa 3 clivada tanto en tejido traumatizado como en tejido control durante los diferentes periodos de cultivo agudo.
- Identificar si existe co-localización entre la proteína caspasa 3 clivada y el antígeno nuclear neuronal NeuN en los tejidos bajo análisis.
- Realizar medidas cuantitativas de área nuclear como apoyo para la interpretación de los cambios en los niveles de la proteína caspasa 3 clivada en los tejidos bajo análisis.
- Interpretar los cambios en los niveles de la proteína caspasa 3 clivada apoyándose en medidas cuantitativas para la expresión de NeuN y de las áreas nucleares, dentro del contexto de vulnerabilidad entendida como inducción de procesos apoptóticos en respuesta a la lesión.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 BIOMODELOS

En este proyecto se emplearon 24 ratas Wistar (*Rattus Novergicus*) machos, adultas, con un peso de entre 330-360 g, asignadas de manera aleatoria a dos grupos experimentales: control y trauma. Cada grupo experimental contó con 12 biomodelos distribuidos equitativamente entre cuatro instantes de observación para el periodo de cultivo: 0h, 2h, 4h y 6h.

4.2 LESIÓN CEREBRAL EXPERIMENTAL

En ratas Wistar adultas con un peso de entre 330 y 360 g se propició un trauma craneoencefálico (TCE) empleando una versión modificada del modelo de Marmarou o modelo de impacto-aceleración por caída libre de un peso (Marmarou *et al.*, 1994; Abd-Elfattah Foda & Marmarou, 1994). La mayor ventaja de este modelo es que reproduce un edema cerebral difuso así como una lesión axonal difusa (DAI) sin asociar contusiones focales ni la ruptura permanente de la barrera hematoencefálica (BHE) (Prieto *et al.*, 2009).

El dispositivo de impacto utilizado consistió de una pesa de 450 g que se dejó caer 1.55 m a través de un tubo de aluminio sobre un disco metálico fijado al cráneo de una rata que se hallaba dispuesta sobre una espuma deformable de poliuretano de densidad 20 kg/m³ (figura 4.1).

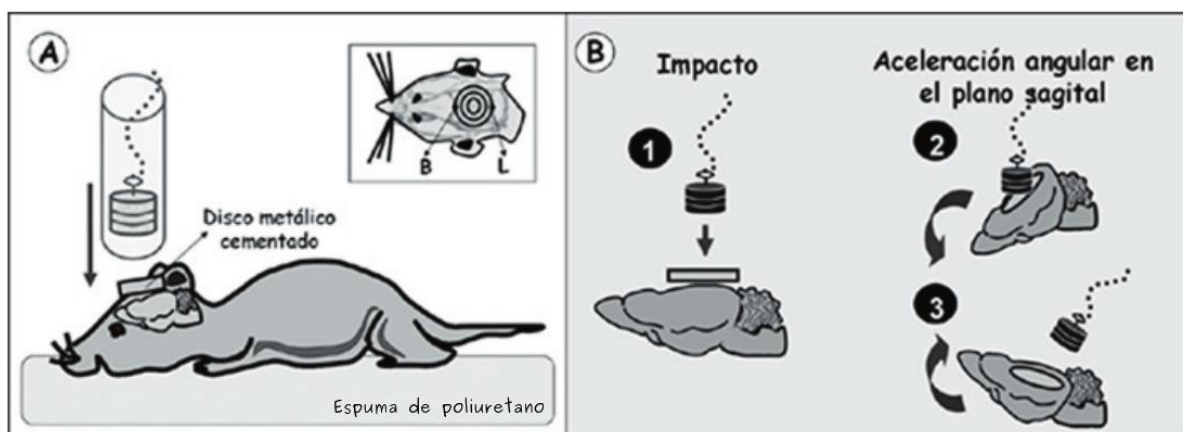


Figura 4.1. Esquema del modelo de impacto-aceleración de Marmarou. A) En primer lugar se coloca un disco metálico sobre el cráneo de la rata, centrado en la línea media entre bregma y lambda. A continuación se coloca el animal sobre una espuma y con la cabeza centrada bajo un tubo de aluminio por el que se deja caer una pesa para que golpee el disco metálico. B) La cabeza de la rata sufre un impacto seguido de una aceleración angular en el plano sagital. (Tomado de Prieto *et al.*, 2009).

El objetivo de fijar el disco metálico es para que se distribuya la fuerza mecánica del impacto por todo el cráneo, disminuyéndose así el riesgo de fracturas craneales y de lesiones focales.

La espuma, al deformarse elásticamente, permite el movimiento angular de la cabeza en el plano sagital en un ciclo completo aceleración-desaceleración cuya carga inercial induce en el cerebro deformaciones por cortante responsables de la lesión generada (Voigt *et al.*, 1977; Gennarelli *et al.*, 1982; Povlishock & Christman, 1995; Povlishock *et al.*, 1997).

Para provocar el TCE, todas las ratas se sometieron, en cámara de anestesia, a anestesia general por aproximadamente 30 minutos. En cada rata la inducción de la anestesia se llevó a cabo en los primeros 5-7 minutos empleando una mezcla de 4% isoflurano – 96% oxígeno. Entonces se extrajo la rata de la cámara de anestesia y, administrándole ahora los gases con máscara, se le practicó una incisión en la línea media del escapo seguido de una elevación periosteal para exponer el área central de la bóveda craneal entre las suturas coronal y lambdoidea. En esta área se fijó con adhesivo de cianocrilato un disco metálico de 2.5 cm de diámetro y 2 mm de grosor. Luego, y de manera muy rápida, se retiró la máscara de gases y se colocó la rata boca abajo en la espuma de tal manera que el disco metálico quedara centrado con el borde inferior del tubo por el que caería la pesa. Entonces se soltó la pesa y una vez impactado el disco metálico se apartó del tubo a la espuma junto con la rata para evitar un segundo golpe. Este procedimiento de impacto con suspensión de anestesia no tuvo una duración mayor a 15 segundos. Seguido se trasladó la rata de nuevo a la cámara de anestesia donde permaneció por aproximadamente 15 minutos, esta vez con una mezcla de mantenimiento de 2% isoflurano – 97% oxígeno. Finalizado este periodo se sacó la rata de la cámara de anestesia y, administrándole los gases vía máscara, le fue retirado el disco metálico y se suturó la incisión, después de lo cual se le trasladó a su jaula para permitirle la recuperación de la anestesia. El periodo de recuperación duró en promedio 10 minutos, tiempo después del cual las ratas despertaron completamente. El tiempo total de monitoreo post-lesión fue de aproximadamente 40 minutos: 20 minutos en la etapa de mantenimiento anestésico, 10 minutos en el periodo de recuperación de la anestesia, y 10 minutos de valoración cualitativa motora una vez las ratas despertaron completamente. Finalmente las ratas fueron trasladadas al bioterio de la Universidad del Valle donde se mantuvieron por 48 horas hasta la extracción de los cerebros.

A los animales pertenecientes al grupo experimental trauma se les indujo el TCE como se acaba de describir. Los pertenecientes al grupo control se sometieron al mismo procedimiento excepto que la pesa no se dejó caer sobre sus cabezas.

Los procedimientos a los que fueron sometidos los biomodelos siguieron las normas de ética convencionales requeridas por el Comité de Evaluación Ética en Animales de Experimentación de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, con aceptación bajo el Acta No. 001 de 2011. El trabajo de investigación presente, se enmarca dentro del proyecto de investigación aprobado y financiado por la Vicerrectoría de Investigaciones de la Universidad del Valle, código 1698 del año 2012.

4.3 CULTIVO ORGANOTÍPICO AGUDO DE TAJADAS CEREBRALES

Transcurridas 48 h post-trauma los sujetos fueron sacrificados bajo anestesia por decapitación y sus cerebros rápidamente extraídos (con excepción de los grupos experimentales correspondientes a las 0h de cultivo, ver sección §4.4). En condiciones de esterilidad e irrigación constante con líquido cefalorraquídeo artificial (LCR_a) (NaCl 124 mM, KCl 5mM, NH₂PO₄ 1.24 mM, MgSO₄ 1.3 mM, NaHCO₃ 26 mM, CaCl₂ 2mM y Glucosa 10 mM a pH 7.4) se removieron coágulos y meninges, y empleando una hoja de afeitar se realizaron cortes coronales de entre 2000 y 2500 μ m, descartando el bulbo olfatorio y el cerebelo. Después de una limpieza adicional de las tajadas con LCR_a para remover detritus y sangre, éstas se trasladaron a dos cámaras, control y trauma, para cultivo organotípico agudo. Las cámaras empleadas son una versión modificada a la descrita por Krimer y Goldman-Rakic (Krimer & Goldman-Rakic, 1997) que ha sido previamente detallada (Riascos et al., 2007) (figura 5.2). En las cámaras, las tajadas se sostuvieron sobre una malla en la interfase dispuesta por un flujo continuo de LCR_a a 2cc/min y una mezcla gaseosa de O₂ al 95% y CO₂ al 5% con burbujeo permanente, a 36 °C (Baño de agua Julabo SW22) y pH fisiológico.

Las tajadas se cultivaron así por periodos de 2, 4 y 6 horas.

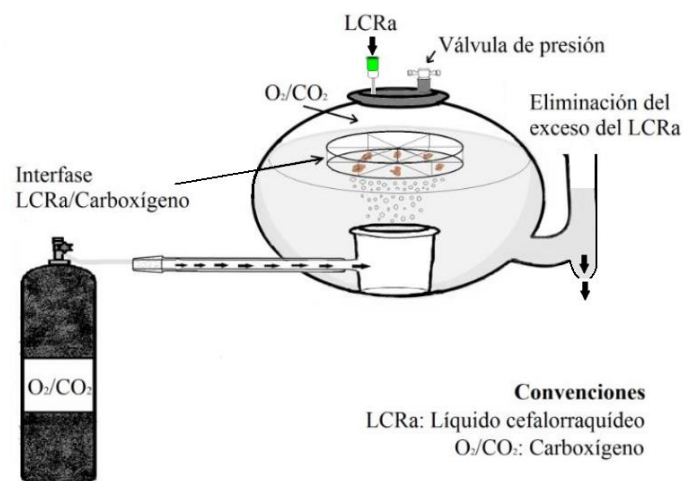


Figura 4.2. Cámara de cultivo organotípico agudo modificada de Krimer y Goldman-Rakic (Krimer & Goldman-Rakic, 1997). Parte superior, diseño esquemático de la cámara (modificado de Guzman, 2013). Parte inferior izquierda, disposición de la cámara dentro del dispositivo regulador de temperatura (Baño de agua Julabo SW22); inferior derecha, detalle de la disposición de las tajadas dentro de la cámara.

4.4 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

Los grupos experimentales correspondientes a las 0 h de cultivo, es decir, no cultivados, transcurridas 48 h post-trauma fueron sometidos a perfusión intracardiaca con 250ml de solución salina al 0.9% y 250ml del fijador paraformaldehído-lisina-periodato (PLP) pH 7.4. El encéfalo fue extraído y puesto en la misma solución de fijación durante 48 horas a 4 °C. Los procedimientos de crioprotección, congelación y corte, fueron idénticos a los que se describirán a continuación para los cerebros cultivados.

Finalizado el tiempo de cultivo las tajadas fueron extraídas de las cámaras y sumergidas para fijación en PLP a 4 °C durante 4 días; después, dispuestas para crioprotección en gradientes de sacarosa al 10%, 20% y 30% en *buffer* fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) 1X por 3 días consecutivos; seguido, se congelaron por inmersión en isopentano enfriado en hielo seco y se almacenaron a -70 °C.

Con el empleo de un criostato (Leica CM3050 S) se realizaron cortes coronales de 30 µm a las tajadas congeladas. De cada muestra de tejido se descartaron los primeros y últimos 200 µm para evitar las áreas afectadas por la disección y por el contacto con la malla de soporte al interior de las cámaras de cultivo. Los cortes se almacenaron en solución anticongelante (glicerol al 20% y etilenglicol al 30% en PBS 10X) a -20 °C hasta ser procesados por inmunofluorescencia/histoquímica. Todos los ensayos se llevaron a cabo en pozos.

Inmunofluorescencia (triple marcaje NeuN-Casp3-Hoechst)

Los tejidos se lavaron 3 veces por 10 minutos cada vez en PBS 1X; luego se incubaron por 20 minutos a Temperatura (T) ambiente en solución para bloqueo de aldehídos (glicina 0.3M en PBS 1X) seguido de 3 lavados por 5 minutos cada vez en PBS 1X. Por 1 h se incubaron a T ambiente en suero de bloqueo (albumina de suero bovino al 1% y Triton X-100 al 0.5% en PBS 1X). Seguido se incubaron con los anticuerpos primarios *mouse anti-NeuN* 1:2500 (Chemicon International) y *rabbit anti-cleaved caspase 3* 1:500 (Cell Signaling Technology) por 18 h a 4 °C en suero de bloqueo. Finalizado este paso se hicieron de 3 lavados por 5 minutos cada vez en PBS 1X y, trabajando de aquí en adelante en cuarto oscuro, se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 594 *goat anti-mouse* 1:2000 y Alexa Fluor 488 *goat anti-rabbit* 1:1000 (Invitrogen) por 1 h y 20 minutos a T ambiente en suero de bloqueo. Después de 3 lavados por 5 minutos cada vez en PBS 1X, se incubó el tejido en Hoechst 33258 1:1000 (Invitrogen) por 5 minutos a T ambiente en PBS 1X seguido de múltiples lavados en PBS 1X intercalados con enjuagues de 15 segundos en

agua destiDAla. Finalmente los tejidos se montaron en placas revestidas con gelatina y se dejaron secar al aire por 15-20 minutos, después de lo cual se les aplicó el medio de montaje Vectashield Hard Set (Vector Laboratories) y se cubrieron con laminillas para ser almacenados a 4 °C. Para evaluar la especificidad en la inmunotinción, un ensayo de control negativo fue ejecutado omitiendo los anticuerpos primarios. El control negativo mostró ausencia de inmunorreactividad en los tejidos.

Inmunohistoquímica (Casp3)

Los tejidos se lavaron 3 veces por 10 minutos cada vez en PBS 1X; luego se incubaron por 15 minutos a T ambiente en solución para bloqueo de peroxidasas endógenas (metanol al 30% y peróxido de hidrógeno al 0.3% en agua destiDAla) seguido de 3 lavados por 5 minutos cada vez en PBS 1X. Por 40 minutos se incubaron a T ambiente en suero de bloqueo (suero normal de cabra al 1.5% y Triton X-100 al 0.5% en PBS 1X). Seguido se incubaron con el anticuerpo primario *rabbit anti-cleaved caspase 3* 1:200 (Cell Signaling Technology) por 18 h a 4 °C en suero de bloqueo. Finalizado este paso se hicieron de 3 lavados por 5 minutos cada vez en PBS 1X. Los tejidos se expusieron por 40 minutos a incubación en Biotina y, posteriormente, lavados con PBS 1X 3 veces por cinco minutos cada uno, a lo cual siguió incubación en Avidina/Biotina (Vectastain ABC Kit; rabbit IgG PK-6101, Vector Laboratories), también durante 40 minutos. Terminado este proceso, los tejidos se lavaron nuevamente con PBS 1X y se les adicionó una solución que contenía Diaminobencidina al 4%, peróxido de hidrógeno al 2% y níquel al 2% en PBS 1X (Peroxidase Substrate Kit; DAB SK-4100, Vector Laboratories) durante 5 minutos. El tejido se lavó nuevamente con PBS 1X y se montó en placas revestidas con gelatina. Las placas se dejaron secando hasta el día siguiente y los tejidos se cubrieron con un medio de montaje (Fisher PermOUNT Mounting Media) y se pusieron laminillas. Para evaluar la especificidad en la inmunotinción, un ensayo de control negativo fue ejecutado omitiendo el anticuerpo primario. El control negativo mostró ausencia de inmunorreactividad en los tejidos.

4.5 CAPTURA Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Las muestras procesadas por inmunofluorescencia fueron fotografiadas con una cámara digital AxioCam HRc (Carl Zeiss) acopDAla a un microscopio Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss) iluminado con una lámpara de mercurio X-Cite 120Q. Este tipo de configuración es referido como microscopía de fluorescencia de campo amplio. Las capturas se realizaron con el programa ZEN 2009 (Carl Zeiss) en formato RGB de 8 bits, tipo entero sin signo, con una resolución de 1388 x 1040 píxeles. Las fotografías se tomaron secuencialmente entre los tres marcadores analizados. Para Hoechst se empleó el cubo de filtros 49 (Excitación G 365, Divisor de haz FT 395, Emisión BP 445/50), para NeuN (Alexa Fluor 594) el cubo de filtros 20 (Excitación BP 546/12, Divisor de haz FT 560, Emisión BP 575-640), para Casp3 (Alexa Fluor 488) el cubo de filtros 46 (Excitación BP 500/20, Divisor de haz FT 515, Emisión BP 535/30);

todos ellos de Carl Zeiss. Las fotografías se tomaron empleando los objetivos Carl Zeiss EC Plan-Neofluar 20x/0.5 y Plan-Apochromat 40x/1.3 en aceite. Para cada marcador se fijó independientemente el tiempo de exposición (objetivo 20x: Hoechst 10 ms, NeuN 800 ms, Casp3 1 s; objetivo 40x: Hoechst 2 ms, NeuN 400 ms, Casp3 900 ms) y la intensidad de la lámpara de mercurio (objetivo 20x: Hoechst 50%, NeuN 100%, Casp3 100%; objetivo 40x: Hoechst 12%, NeuN 25%, Casp3 50%). Estos valores se mantuvieron constantes para todas las fotografías tomadas. Los tiempos de exposición reales siempre fueron mayores, pero constantes, a los establecidos para la cámara digital; esto debido principalmente al retardo entre el mando del software de captura y la acción motorizada del obturador del microscopio.

Por cada biomodelo fueron fotografiadas 6 secciones coronales procurando que estuvieran igualmente espaciadas entre los bregma 3.00 mm y -4.44 mm; esta es una distribución espacial aproximadamente simétrica respecto de la comisura blanca anterior. Las fotografías con objetivo de 20x destinadas al cálculo de inmunorreactividad fueron tomadas primero, sin exceder de 10 fotografías por marcador por sección coronal. Después se tomaron las fotografías con objetivo de 20x destinadas al cálculo de densidad celular (solo para Casp3); en este caso se pudieron tomar en promedio otras 10 fotografías antes de detectar alteración significativa en la fluorescencia. Finalmente se tomaron las fotografías con objetivo de 40x destinadas al cálculo de las áreas nucleares planimétricas. El orden en la toma de fotografías obedeció a priorizar la calidad de la fluorescencia para el cálculo de la inmunorreactividad antes de experimentar deterioro en las muestras por *photobleaching* (destrucción fotoquímica del fluoróforo como resultado de la sobreexposición de la muestra a la luz), y permitió definir al objetivo de 20x como nuestro “objetivo base de trabajo”.

Las muestras procesadas por inmunohistoquímica fueron fotografiadas con una cámara digital DFC 295 (Leica) acopdAla a un microscopio Leica DM750 iluminado por LED y empleando el objetivo Leica Plan 4x/0.10. Las capturas se realizaron con el programa *Leica application suite* 3.8.0 en formato Tiff de 8 bits, tipo entero sin signo, con una resolución de 2048 x 1536 pixeles. Estas fotografías se tomaron solamente para la marcación de Casp3 en cortes coronales a nivel del hipocampo como material de apoyo en el cálculo de la inmunorreactividad (ver §4.5.2). En todas estas fotografías se fijó un tiempo de exposición de 34.9 ms, manteniendo también constante la intensidad de la iluminación.

Todos los análisis de imágenes se realizaron con el programa ImageJ 1.48 (NIH, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

4.5.1 Deconvolución de las imágenes digitales

La deconvolución se aplicó a imágenes de fluorescencia 2D de manera previa al cálculo de la inmunorreactividad (ver §4.5.2), incrementando la relación señal/*background* en las capturas digitales (figura 4.3).

En microscopía de fluorescencia de campo amplio los cortes histológicos se iluminan por completo, lo que produce la excitación de una gran cantidad de fluoróforos y la emisión de luz desde cualquier parte de la muestra. Así, las imágenes capturadas están compuestas de la luz tanto del plano focal como de todos los planos fuera de foco, lo que produce la apariencia desenfocada o difusa, referida como *blurring*, característica de este tipo de microscopía. El *blurring* será menos pronunciado entre más delgados sean los cortes histológicos puesto que así la luz total emitida de los planos fuera de foco será menor. En esencia, el *blurring* se origina por la difracción espacial de la luz originada desde una fuente puntual. El patrón de esta difracción es conocido como la *point spread function* (PSF) del microscopio, y es una función de sus propiedades ópticas. Se puede pensar en una imagen capturada digitalmente como el resultado de la modificación que la PSF hará sobre la imagen verdadera de la fluorescencia emitida. Esta modificación puede modelarse en términos matemáticos mediante la operación convolución. Lo que significa que para contrarrestar el *blurring*, y reasignar la luz fuera de foco a su punto de origen, es necesario aplicar sobre las imágenes capturadas una operación inversa a la convolución, esta operación es la deconvolución.

Para poder computar la deconvolución es necesario disponer de la PSF del microscopio. En este proyecto la PSF se estimó de manera teórica según el modelo de difracción de Born & Wolf (Gibson & Lanni, 1989; Born & Wolf, 2003; Kirshner *et al.*, 2013), ver tabla 4.1. En este modelo la PSF es invariante al desplazamiento, es decir, constante en todos los puntos del espacio; además se asume que no posee ningún tipo de aberración, es decir, que es perfectamente simétrica respecto del plano xy y del eje z.

La deconvolución entre las imágenes digitales y la PSF se computó empleando el método generalizado de Tikhonov con condiciones de frontera reflectantes y un *stencil* Laplaciano (Hansen *et al.*, 2006; Wendykier, 2009). Este es un algoritmo de filtrado espectral que tiene la ventaja de ser de rápida ejecución, principal razón por la cual fue escogido.

Objetivo	Zeiss EC Plan-Neofluar 20x/0.50 M27	Zeiss Plan-Apochromat 40x/1.3 Oil DIC M27
Apertura numérica	0.5	1.3
Índice de refracción de inmersión	1	1.518
Longitud de Onda	520 nm (Alexa 488) 619 nm (Alexa 594)	520 nm (Alexa 488) 619 nm (Alexa 594)
Tamaño de pixel	0.51 μm	0.26 μm

Tabla 4.1. Parámetros empleados en el modelo de Born & Wolf para la estimación teórica de la PSF.

4.5.2 Cálculo de la inmunorreactividad

Inmunofluorescencia

En inmunofluorescencia la inmunorreactividad (IR) se calculó en imágenes capturadas con el objetivo de 20x (Zeiss EC Plan-Neofluar 20x/0.50 M27). Con una magnificación total de 200x (objetivo 20x y ocular 10x) es difícil disponer de estructuras completas dentro de una imagen, por lo que la cuantificación de la IR en inmunofluorescencia se refirió a secciones de estas estructuras (ver el ejemplo de la figura 4.3).

La cuantificación de la IR se basó en el valor de los píxeles para la región de interés (ecuación 4.1). Los píxeles son las unidades más pequeñas que constituyen una imagen digital. En términos prácticos cada pixel es un número cuyo valor es una medida de la intensidad de luz emitida por la muestra. Los valores obtenidos de las imágenes capturadas digitalmente tuvieron un rango desde 0 hasta 255. Un valor de pixel igual a cero correspondió a la ausencia de luz (color negro), mientras que un valor de 255 correspondió a la máxima intensidad de luz soportada por el formato de adquisición. En la ecuación 4.1, los valores de los píxeles de la región de interés se corrigieron por *background*, eliminando así la variabilidad en el *background* entre los diferentes cortes.

Para el cálculo de la IR se hizo uso del promedio de los valores de los píxeles y no de sus valores totales o integrados, lo que permitió independizar este cálculo del área de las estructuras analizadas. Lo anterior es importante al considerar la premisa de que en inmunofluorescencia de cortes histológicos el nivel de fluorescencia emitido por alguna región de la muestra debe ser función de su expresión antigénica (o de su inmunorreactividad) y no del tamaño de la región analizada.

$$IR_{vp} = \overline{VP}_{roi} - \overline{VP}_{background} \quad (4.1)$$

Dónde:

IR_{vp} : inmunorreactividad por valor de pixel

\overline{VP}_{roi} : valor promedio de los píxeles para la región de interés

$\overline{VP}_{background}$: valor promedio de los píxeles para el *background*

En la determinación de la IR, tanto la región de interés como el *background* se delinearon a mano, ver figura 4.3. El área seleccionada como *background* fue representativa del *background* presente en la imagen, y en especial en la región de interés; si por ejemplo la región de interés presentó autofluorescencia de capilares o daño en el tejido manifestado por parches con cero fluorescencia, entonces la muestra tomada como *background* también incluyó estas características.

Para los análisis, los hemisferios derecho e izquierdo del cerebro se utilizaron para producir una medida promedio de la IR por cada región de interés en cada biomodelo.

Inmunohistoquímica

En inmunohistoquímica la inmunorreactividad (IR) se calculó en imágenes capturadas con el objetivo de 4x (Leica Plan 4x/0.10).

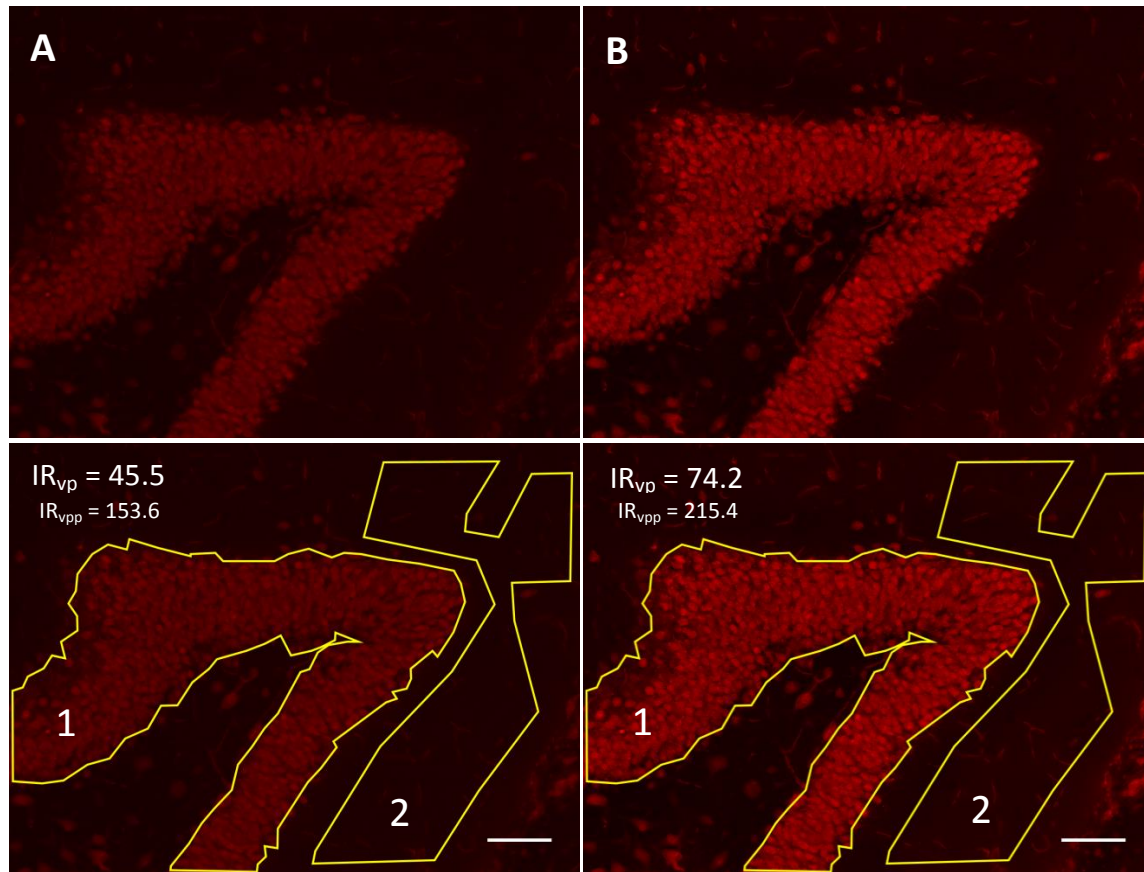


Figura 4.3. Cálculo de la IR por valor de pixel para NeuN en una sección del giro dentado. Delineación de las estructuras y efecto de la deconvolución. A: imagen no deconvolucionada; B: imagen deconvolucionada; IR_{vp}: inmunorreactividad por valor de pixel; IR_{vpp}: inmunorreactividad por valor de pixel como valor porcentual del *background*. En la parte inferior de la figura se han delineado la región de interés (1) y el *background* (2). Nótese que dentro del *background* se incluye la autofluorescencia de capilares. Debido a que en el cálculo de la IR se emplean valores promedio, la región de interés no necesita ser delineada con mucha precisión; en la práctica esto implica una ventaja pues en general resulta difícil determinar los límites exactos de las estructuras. En la gráfica se ha expresado también la IR como valor porcentual del *background* (IR_{vpp}) con el objetivo de ilustrar explícitamente como el mayor valor obtenido en B indica que la relación señal/*background* mejora con la deconvolución. La barra corresponde a 80 μ m.

La cuantificación de la IR fue evaluada mediante valores de densidad óptica relativa (ROD, por sus siglas en inglés) para la región de interés (ecuación 4.2). Estos valores se obtienen después de aplicar una transformación no lineal a los valores de pixeles empleando la fórmula: $ROD = \log(255/\text{valor promedio de los pixeles})$ (Hwang *et al.*, 2006). En la ecuación 4.2, los valores ROD para la región de interés han sido corregidos por *background*,

eliminando así la variabilidad en el *background* entre los diferentes cortes, y escaDAlos arbitrariamente para facilitar su visualización.

$$IR_{ROD} = \log\left(\frac{\overline{VP}_{background}}{\overline{VP}_{roi}}\right) \times 1000 \quad (4.2)$$

Dónde:

IR_{ROD} : inmunorreactividad por densidad óptica relativa

\overline{VP}_{roi} : valor promedio de los pixeles para la región de interés

$\overline{VP}_{background}$: valor promedio de los pixeles para el *background*

En las imágenes digitales para la inmunohistoquímica, y contrario a las de inmunofluorescencia, un valor de pixel bajo (menos luz atravesando la muestra) se relaciona con una mayor expresión de la proteína bajo análisis, es por eso que el concepto de densidad óptica (o absorbancia), que indica (se relaciona linealmente con) la concentración de moléculas absorbentes de luz (en nuestro caso la proteína de interés) cobra utilidad aquí. Además, el rango del histograma de pixeles de nuestras imágenes para inmunohistoquímica fue amplio, justificando así la transformación no lineal de los datos (Lazic, 2009).

En lo referente a la selección de la región de interés y del *background*, se siguió aquí el mismo procedimiento descrito para la inmunofluorescencia. Para los análisis, los hemisferios derecho e izquierdo del cerebro se utilizaron para producir una medida promedio de la IR por cada región de interés en cada biomodelo.

4.5.3. Estimación de la densidad para la IR tipo puntos

La densidad de la inmunorreactividad tipo puntos (ver sección §5.3) se evaluó sobre una ventana de conteo celular de 0.2 mm² (400x500 µm²) en un total de 1730 imágenes capturadas con el objetivo de 20x (figura 4.4). La ventana de conteo no estuvo fija espacialmente, de manera que se permitiera su ubicación en alguna región representativa dentro de la imagen digital para la IR tipo puntos. Por cada imagen solo se ejecutó una vez la ventana de conteo. Para evitar falsos positivos en el conteo debido a impurezas fluorescentes o a autofluorescencia, solo se incluyeron aquellas marcaciones que co-localizaran con Hoechst.

4.5.4 Estimación del tamaño nuclear

El tamaño nuclear se evaluó mediante la medida del área nuclear planimétrica en un total de 5960 núcleos (4698 en capas piramidal y granular del hipocampo y 1262 para la IR tipo

puntos) con perímetros manualmente delineados y capturados, en tinción de Hoechst, con el objetivo de 40x (figura 4.5). En la delineación de los perímetros, inicialmente se hizo en ellos un ajuste grueso de una elipse o un ovalo, según correspondiera mejor a cada caso, luego, manualmente se manipularon los bordes de estas formas geométricas para hacerlos corresponder con los límites visibles nucleares.

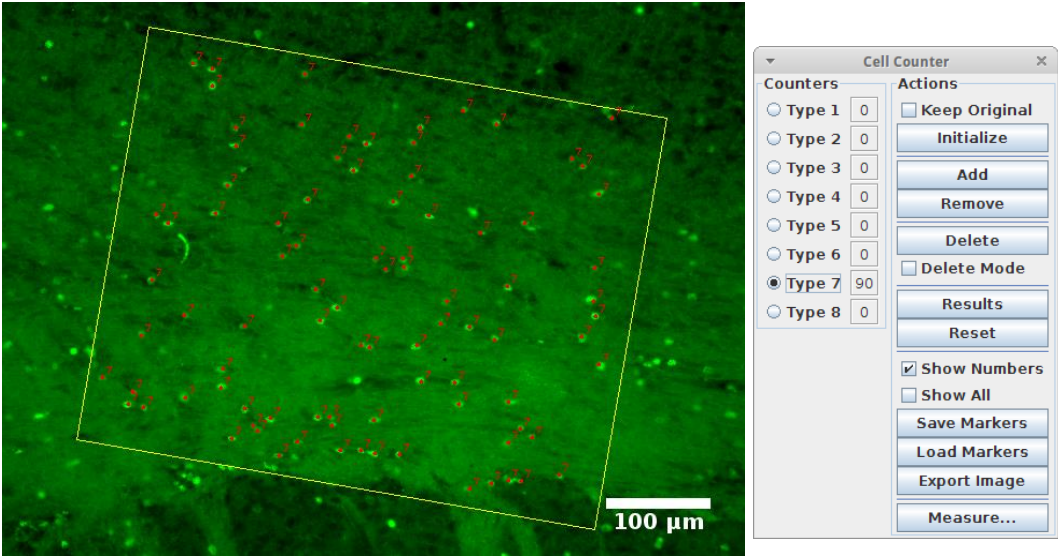


Figura 4.4. Conteo celular para la estimación de la densidad de la IR tipo puntos. Los conteos se efectuaron sobre una ventana de $400 \times 500 \mu\text{m}^2$. En la gráfica se muestra un ejemplo para el cuerpo calloso.

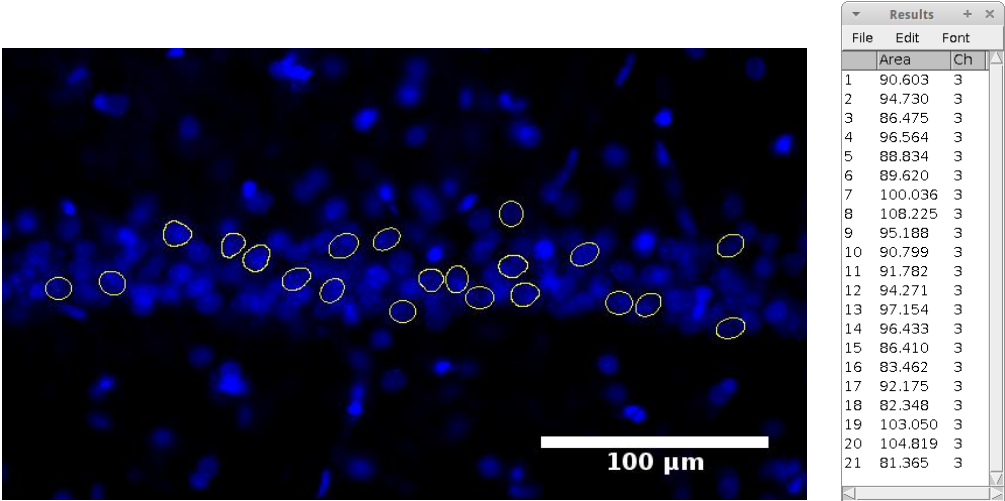


Figura 4.5. Delineación de perímetros nucleares para la estimación del tamaño nuclear. En la gráfica se muestra un ejemplo para CA1. Los núcleos se delinean en capturas para la tinción de Hoechst. El programa ImageJ automáticamente calcula las áreas planimétricas de los núcleos así delineados.

En las capas piramidal y granular del hipocampo, primero se establecieron sus límites empleando la marcación de NeuN y luego se efectuó la delineación de perímetros nucleares a células que estuvieran dentro de estos límites sin importar el grado de co-localización con NeuN, pero verificando la no co-localización con la IR tipo puntos. De esta manera el muestreo en esta población de células no estuvo sesgado hacia aquellas con mayor IR para NeuN, presumiblemente más sanas, ni tampoco contaminado con elementos de otra población, la IR tipo puntos.

4.5.5 Co-localización

La evaluación de la co-localización se hizo cualitativamente, comparando los canales bajo análisis y visualmente identificando las regiones de la imagen con igual distribución de la marcación. Este tipo de evaluación es indicada en casos como el nuestro, donde las moléculas de interés ocupan un espacio celular de gran dimensión como lo es el núcleo, de tal forma que la superposición de marcaciones, si las hay, resulta obvia (MacDonald & Dunn, 2013). De esta manera se hace innecesario el uso de métodos estadísticos cuyos resultados suelen ser en muchos casos difíciles de interpretar (Dunn *et al.*, 2011; Mansoor, 2012).

La identificación visual de la co-localización en imágenes superpuestas (“merge”), depende en gran medida de la igualdad en las intensidades de los colores para los canales analizados, así, el color intermedio resultante en el *merge* indicaría las zonas de co-localización. Sin embargo, en la práctica tal restricción en estas intensidades es de raro cumplimiento, es por ello que la manera más confiable de comparar visualmente la distribución relativa de dos marcadores es la comparación DAlo a DAlo de las dos imágenes (Dunn *et al.*, 2011). Con esto en consideración, en este proyecto todas las comparaciones se han hecho DAlo a DAlo, aún cuando también se ha incluido el *merge*.

Todas las co-localizaciones fueron verificadas en el canal para Hoechst, de tal forma que los falsos positivos por superposición nuclear en los planos de corte, o también debidos a impurezas fluorescentes o a autofluorescencia, fueran descartados.

4.6 ANÁLISIS DE DATOS Y ESTADÍSTICA

Se realizó una descripción cualitativa para la distribución regional de la marcación por inmunofluorescencia de caspasa 3 clivada (Casp3) en cada tiempo de cultivo. En aquellas regiones en las que se obtuvo un registro confiable de los cambios en la IR para casp3 se evaluó la co-localización con NeuN.

El análisis cuantitativo para la marcación de casp3 se realizó sobre mediciones de área nuclear planimétrica, inmunorreactividad y densidad celular, comparando estas medidas entre los diferentes tiempos de cultivo para cada grupo experimental de sujetos (trauma y control),

y también entre los grupos experimentales de sujetos para cada tiempo particular de cultivo. En este análisis se emplearon las pruebas paramétricas ANOVA de Fisher con prueba *post-hoc* de Scheffé y ANOVA de Welch con prueba *post-hoc* de Games-Howell, para datos homocedásticos y heterocedásticos respectivamente. Cuando los datos no cumplieron el principio de normalidad se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de múltiples comparaciones con la prueba U de Mann-Whitney con ajuste de Bonferroni para el nivel de significancia. Las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Levene fueron empleadas para corroborar normalidad y homocedasticidad en los datos, respectivamente. Los valores de correlación se evaluaron empleando los coeficientes de Pearson y de Spearman. Como medida para el tamaño del efecto experimental se empleó η^2 en pruebas paramétricas. Para todas las pruebas estadísticas se estableció un nivel de significancia $\alpha=0.05$. Los resultados se expresaron como la media del grupo \pm SEM (error estándar de la media, por sus siglas en inglés). Los análisis cuantitativos se llevaron a cabo en los programas STATISTICA 8.0 y GNU Octave 3.2.4.

5. RESULTADOS

5.1 OBSERVACIONES CLÍNICAS

Todos los 12 biomodelos que recibieron el impacto desde 1.55 m de altura sobrevivieron al trauma y no presentaron fractura de cráneo. Después de 4 segundos post-impacto ningún animal evidenció apnea; este fue el tiempo aproximado transcurrido desde el momento del impacto hasta el momento en que el animal es ingresado a la cámara de anestesia para mantenimiento y monitoreo, por lo tanto, es posible que se hayan presentado eventos de apnea pero con duraciones menores a 4 segundos. Los biomodelos exhibieron un patrón irregular de respiración post-impacto con duración de entre 5 y 15 minutos. No presentaron convulsiones dentro de los 40 minutos de monitoreo post-lesión y tampoco manifestaron signos de decorticación. Después de la recuperación de la anestesia, periodo que tuvo una duración promedio de 10 minutos (tiempo un poco mayor para el grupo trauma en comparación con el grupo control), los biomodelos despertaron completamente y en ninguno se evidenció déficit motor, sin embargo, algunos pocos casos presentaron hipoactividad. Las anteriores características permitieron clasificar la lesión generada por nuestro modelo, como moderada.

5.2 OBSERVACIONES HISTOPATOLÓGICAS MACROSCÓPICAS

Los cerebros de los animales sometidos al impacto lucieron normales sin signos de contusión o de lesiones focales. Los cerebros no cultivados (0 h de cultivo), los cuales se extrajeron después del proceso de perfusión intracardiaca de fijador, no evidenciaron ningún tipo de hemorragia. En los cerebros destinados al cultivo no fue posible verificar la presencia de hemorragias epidurales, subdurales o subaracnoideas, pues el proceso de extracción sin previa perfusión no es apto para este tipo de observaciones. Sin embargo, las hemorragias intraventriculares aún pueden ser detectadas en estos cerebros y de hecho fueron evidenciadas en dos de ellos.

5.3 RESULTADOS CUALITATIVOS

A continuación se relatarán las principales observaciones para la inmunofluorescencia de caspasa 3 clivada, referida como Casp3. A menos que se especifique lo contrario, el empleo de los sustantivos inmunorreactividad (IR) o marcación, en la presente sección, harán siempre alusión a Casp3.

Notas anatómicas

Cuando se haga referencia a los sectores CA3 e Hilus del hipocampo, se adoptará la convención seguida por Paxinos (Paxinos, 2004), donde el sector CA3 incluye la porción terminal de la capa piramidal hipocampal que se inserta dentro de los brazos formados por la capa granular del giro dentado. El Hilus, o capa polimórfica del giro dentado, es el sector en forma de V encerrado por los brazos ya mencionados (también con forma de V). A su vez el Hilus encierra la porción terminal de CA3. Si bien el límite exacto entre los así definidos CA3

e Hilus puede no ser fácil de determinar con las marcaciones empleadas de NeuN o de Casp3, seguir esta convención evita emplear el nombre de Hilus para referirse también a la porción terminal de CA3 que claramente puede ser identificada como capa piramidal (para una mayor discusión sobre este tema y su relación con el término CA4, ver Paxinos, 2004).

El uso de los adjetivos de relación espacial: medial y ventral, en alusión al hipotálamo, se usarán para designar regiones generales en esta estructura, en lugar de áreas definidas con base en la organización de grupos celulares o de propiedades fisiológicas. Así, con hipotálamo ventral, en dirección rostro caudal, se hará referencia a las regiones Preóptica, Anterior, Tuberal y Mamilar, con proximidad a los límites inferiores de la estructura; mientras que con el término hipotálamo medial, se hará referencia a las zonas conocidas como Periventricular y Medial.

De similar manera el término corteza dorsomedial hará referencia a la corteza del Cíngulo; mientras que corteza ventral hará referencia a las regiones de la corteza limitadas superiormente por una línea imaginaria trazada casi que horizontalmente a nivel de la fisura rinal. La corteza ventral así definida (y para el rango bregma: 3.00 mm, -4.44mm, empleado en este proyecto), se referirá principalmente a la corteza Piriforme, pero también incluirá corteza de transición, corteza Peri-amigdalina y corteza Entorrinal Dorsolateral.

Las anteriores convenciones se adoptaron para facilitar la descripción del patrón de inmunorreactividad para Casp3.

TIEMPO 0H DE CULTIVO

Trauma

Los cerebros que fueron fijados inmediatamente se cumplió el periodo post-trauma de 48 horas presentaron dos tipos de marcación para Casp3 de fácil distinción entre sí. Una de estas marcaciones llamó en especial la atención por estar presente en prácticamente todas las regiones de los cortes coronales (figura 5.1), entre ellas, la corteza cerebral, la sustancia blanca, los núcleos de la base, el tálamo, el septum, la habénula, el tubérculo olfatorio, el hipotálamo, la amígdala, el hipocampo y el quiasma y tractos ópticos (aunque en estas últimas dos estructuras la marcación fue menos evidente). Esta marcación se caracterizó por una fluorescencia intensa, por estar muy bien circunscrita a núcleos circulares de pequeño diámetro (figura 5.2 y figura 5.3), y por no co-localizar con NeuN (figura 5.4 y figura 5.5). Nosotros nos hemos referido a esta marcación como “IR tipo puntos”.

Cualitativamente se apreció una mayor densidad de la IR tipo puntos en el hipotálamo ventral, en la habénula y en el cuerpo calloso (figuras 5.1, D, F y G respectivamente), mientras que la cápsula interna presentó una baja densidad. Para las demás regiones no fue fácil apreciar a simple inspección diferencias en este parámetro.

El segundo tipo de marcación para Casp3 presentó una menor fluorescencia (bastante menor) en comparación con la marcación tipo puntos (figura 5.1, I-L). Esta fue también una marcación nuclear pero circunscrita, en términos generales, a núcleos de mayor tamaño que

los de la IR tipo puntos (figura 5.2), y además se caracterizó por co-localizar con NeuN (figura 5.5). Nosotros nos hemos referido a esta marcación como “IR tipo neurona”.

A las 0h de cultivo el hipocampo fue la única región con una marcación tipo neurona fácilmente detectable. Dentro de esta estructura, el Giro Dentado y CA2 presentaron una mayor IR aparente, seguidos de CA3 y CA1 (figura 5.1, I-L). En sectores como el estriado, el tálamo, la habénula, la corteza cerebral (particularmente en regiones ventrales), el tubérculo olfatorio, la amígdala y en el hipotálamo (regiones medial y ventral), también se pudo registrar IR tipo neurona. En estos casos la marcación se restringió a áreas discretas y pequeñas con una señal de fluorescencia bastante débil (figura 5.6).

Control

Las muestras pertenecientes al grupo control también presentaron los dos tipos de marcación para Casp3 descritos para el grupo trauma. Sin embargo, en este caso los niveles de fluorescencia para ambos tipos de marcación se apreciaron disminuidos, y de manera muy notoria para la IR tipo puntos (figura 5.7). A parte del anterior hecho, las marcaciones exhibieron las mismas características que las del grupo trauma, esto es, una menor fluorescencia de la IR tipo neurona en comparación con la IR tipo puntos; para la IR tipo puntos: localización nuclear con núcleos de menor tamaño asociados (figura 5.8); no co-localización con NeuN (figura 5.9); y, distribución amplia por todas las regiones de los cortes coronales, evidenciándose una mayor densidad en la región ventral del hipotálamo, en la habénula y en el cuerpo calloso (figuras 5.7, D, F y G, respectivamente), y una baja densidad en la cápsula interna. Para la IR tipo neurona: localización nuclear con núcleos de mayor tamaño asociados (figura 5.8); co-localización con NeuN (figura 5.9); e IR detectable en el hipocampo, donde la marcación para CA3 y CA1 fue muy baja mientras que el Giro Dentado y CA2 evidenciaron niveles cualitativos semejantes.

A diferencia del grupo trauma, en el grupo control no se pudo detectar IR tipo neurona en regiones diferentes al hipocampo.

TIEMPOS CULTIVADOS

Todos los tejidos cultivados se caracterizaron por presentar autofluorescencia de capilares, fenómeno más acentuado en la banda de emisión del Alexa Fluor 488 (verde) utilizado para el marcaje de Casp3, y menos crítico en la banda de emisión del Alexa Fluor 594 (rojo) empleado para el marcaje de NeuN (en la banda de emisión del Hoechst no autofluorescen los capilares). Este hecho se vio favorecido por la imposibilidad de emplear la perfusión intracardiaca en los biomodelos destinados al cultivo.

Las marcaciones para caspasa 3 que denominamos “IR tipo puntos” e “IR tipo neurona”, conservaron a lo largo de los diferentes tiempos del cultivo sus dos características distintivas, esto es, localización circunscrita a núcleos circulares de pequeño diámetro y no co-localización con NeuN para la IR tipo puntos; y, localización circunscrita a núcleos de diámetro más grande co-localizados con NeuN para la IR tipo neurona. Esto fue soporte

suficiente para continuar empleando los calificativos *tipo punto* y *tipo neurona* a lo largo del proyecto.

Tiempo 2h de cultivo

Trauma

En términos generales la marcación tipo puntos para Casp3 lució más débil (menos fluorescente) y de menor diámetro (más punteada) a partir de las 2h de cultivo. Su densidad se apreció cualitativamente disminuida en regiones como el hipotálamo, el tálamo y el hipocampo, mientras que en la habénula, el estriado y el tubérculo olfatorio pareció conservarse. En la corteza cerebral la distribución de esta marcación siguió siendo amplia entre todas las láminas pero con niveles de fluorescencia diferenciales. En la corteza ventral, todas las láminas mostraron niveles de fluorescencia similares y relativamente altos; en las regiones laterales y dorsales de la corteza solo la lámina I conservó niveles de fluorescencia parecidos a las regiones ventrales, el resto de láminas exhibió una fluorescencia mucho más débil. La excepción a esta característica observada para la lámina I se presentó en la corteza dorsomedial, donde prácticamente perdió toda su IR tipo puntos.

La marcación tipo neurona para Casp3 pareció mostrar un incremento respecto de las 0h de cultivo en el hipocampo, en CA3, CA2 y CA1. En el giro dentado este incremento no fue evidente, más bien allí la marcación lució algo similar, o incluso menor, a la del grupo trauma de las 0h. En el hipocampo, y a diferencia de las 0h, se presentó también este tipo de marcación para Casp3 en algunas neuronas del Hilus. La IR tipo neurona se registró también en otros sectores como el estriado, el tálamo, la habénula, la corteza cerebral (particularmente en regiones ventrales), el tubérculo olfatorio, la amígdala y en el hipotálamo (medial y ventral). La marcación en la mayoría de estos casos estuvo restringida a áreas discretas con una señal de fluorescencia mucho menor a las registradas en el hipocampo.

Control

La inmunofluorescencia para los tejidos del grupo control lució en términos generales muy similar a la del grupo trauma; por ello cualitativamente resultó muy difícil establecer diferencias entre estos dos grupos experimentales. Esto fue muy opuesto a lo observado para las 0h de cultivo, donde a simple inspección se podía distinguir cuál muestra pertenecía al grupo control y cuál al de trauma tan solo por la relación cualitativa señal/*background* (contrastar figuras 5.1 y 5.7).

La IR tipo puntos se apreció disminuida en las mismas regiones que para el grupo trauma, esto es, en el hipotálamo, el tálamo y el hipocampo, pero adicionalmente también en el cuerpo calloso. En la habénula, el estriado y el tubérculo olfatorio la densidad pareció conservarse. En la corteza cerebral, y al igual que para el grupo trauma, la distribución de esta marcación siguió siendo amplia entre todas las láminas con niveles de fluorescencia diferenciales. En las regiones ventrales de la corteza, todas las láminas mostraron niveles de fluorescencia similares y relativamente altos; en las regiones laterales y dorsales de la corteza solo la lámina I conservó niveles de fluorescencia parecidos a las regiones ventrales, el resto de láminas exhibió una fluorescencia mucho más débil. De nuevo la excepción a esta

característica observada para la lámina I se presentó en la región dorsomedial, donde prácticamente perdió toda su IR tipo puntos.

En el hipocampo la marcación tipo neurona para Casp3 pareció mostrar un incremento respecto de las 0h. Dicho aumento en este tipo de IR esta vez, y a diferencia del grupo trauma, incluyo además de CA3, CA2 y CA1, al giro dentado. Asimismo algunas neuronas del Hilus mostraron inmunorreactividad. A las 2h de cultivo también se registró IR tipo neurona en sectores como el estriado, el tálamo, la habénula, la corteza cerebral (particularmente en la corteza piriforme), el tubérculo olfatorio, la amígdala y en el hipotálamo (medial y ventral). La marcación en la mayoría de estos casos estuvo restringida a áreas discretas con una señal de fluorescencia mucho menor a las registradas en el hipocampo, sin embargo, la detectabilidad en estas áreas discretas fue un poco más alta que para el grupo trauma.

Tiempo 4h de cultivo

Trauma

Para las 4h de cultivo la IR tipo puntos sufrió una muy notoria disminución. En la corteza cerebral prácticamente desapareció de todas las láminas corticales, con excepción de la lámina I, con niveles de fluorescencia relativamente altos. De igual forma solo la lámina I del tubérculo olfatorio conservó la marcación. También se registró pérdida en esencia total para este tipo de marcación en el septum, el tálamo, el hipotálamo medial, el hipocampo y la cápsula interna. En la región dorsomedial del estriado (que limita con los ventrículos laterales), quedaron algunos vestigios de esta marcación, sin embargo en el resto de la estructura fue casi nula. En la habénula, la IR tipo puntos se redujo considerablemente en los sectores laterales, quedando casi que restringida solo al núcleo medial. En el cuerpo calloso, si bien no hubo pérdida total de la marcación, sí se evidenció un decremento significativo. En el hipotálamo ventral la IR tipo puntos pareció conservarse.

CA2 y CA1, en el hipocampo, presentaron niveles similares de IR tipo neurona, y a su vez mayores que en el giro dentado y CA3. Cualitativamente solo en el giro dentado se pudo apreciar una disminución significativa de la IR tipo neurona en comparación con las 2h de cultivo, mientras que el Hilus presentó un aumento en esta inmunorreactividad. Por fuera del hipocampo la IR tipo neurona se incrementó particularmente en regiones ventrales del tejido nervioso, como el hipotálamo, el tubérculo olfatorio, la amígdala y la corteza piriforme, donde los niveles de inmunofluorescencia fueron en ocasiones comparables a los del hipocampo, aunque restringidos a áreas discretas. También presentaron este tipo de IR el estriado, el tálamo, la habénula y las regiones lateral y dorsal de la corteza cerebral, aunque en zonas de muy pequeña extensión y siempre con baja fluorescencia.

Control

La IR tipo puntos en la corteza cerebral y el tubérculo olfatorio de los controles prácticamente desapareció de todas las láminas con excepción de la I, de manera similar al grupo trauma. Regiones como el septum, el tálamo, el hipotálamo medial, el hipocampo y la sustancia blanca, presentaron un decremento alto en esta marcación más no una desaparición total como se vio para algunas de estas regiones en trauma. En la región dorsomedial del estriado se pudieron apreciar remanentes de la IR tipo puntos, pero en los demás sectores la

marcación fue difícilmente detectable. En la habénula, solo el núcleo medial pareció conservar la marcación, al igual que la región ventral del hipotálamo.

La IR tipo neurona mantuvo las mismas características descritas para el grupo control, con tan solo un poco más de IR aparente en las regiones ventrales del tejido nervioso (hipotálamo, tubérculo olfatorio, amígdala y corteza piriforme).

Tiempo 6h de cultivo

Trauma

Transcurridas 6h de cultivo tan solo el núcleo medial de la habénula, la región ventral del hipotálamo y las láminas I de la corteza cerebral y del tubérculo olfatorio presentaron IR tipo puntos. En las demás regiones esta marcación para Casp3 desapareció. La densidad de la IR tipo puntos en el núcleo medial de la habénula y la lámina I del tubérculo olfatorio lució menor, mientras que en los demás sectores mencionados pareció no haber cambiado mucho con respecto a las 4h de cultivo.

En el hipocampo, la IR tipo neurona pareció haber conservado los mismos niveles que a las 4h de cultivo. Por fuera del hipocampo este tipo de marcación solo se detectó en el hipotálamo, con una evidente disminución en la densidad celular.

Control

Cualitativamente no se pudieron establecer diferencias entre la inmunofluorescencia para Casp3 de las muestras pertenecientes al grupo control y las pertenecientes al grupo trauma. Las mismas características descritas para el grupo trauma aplican en este ítem.

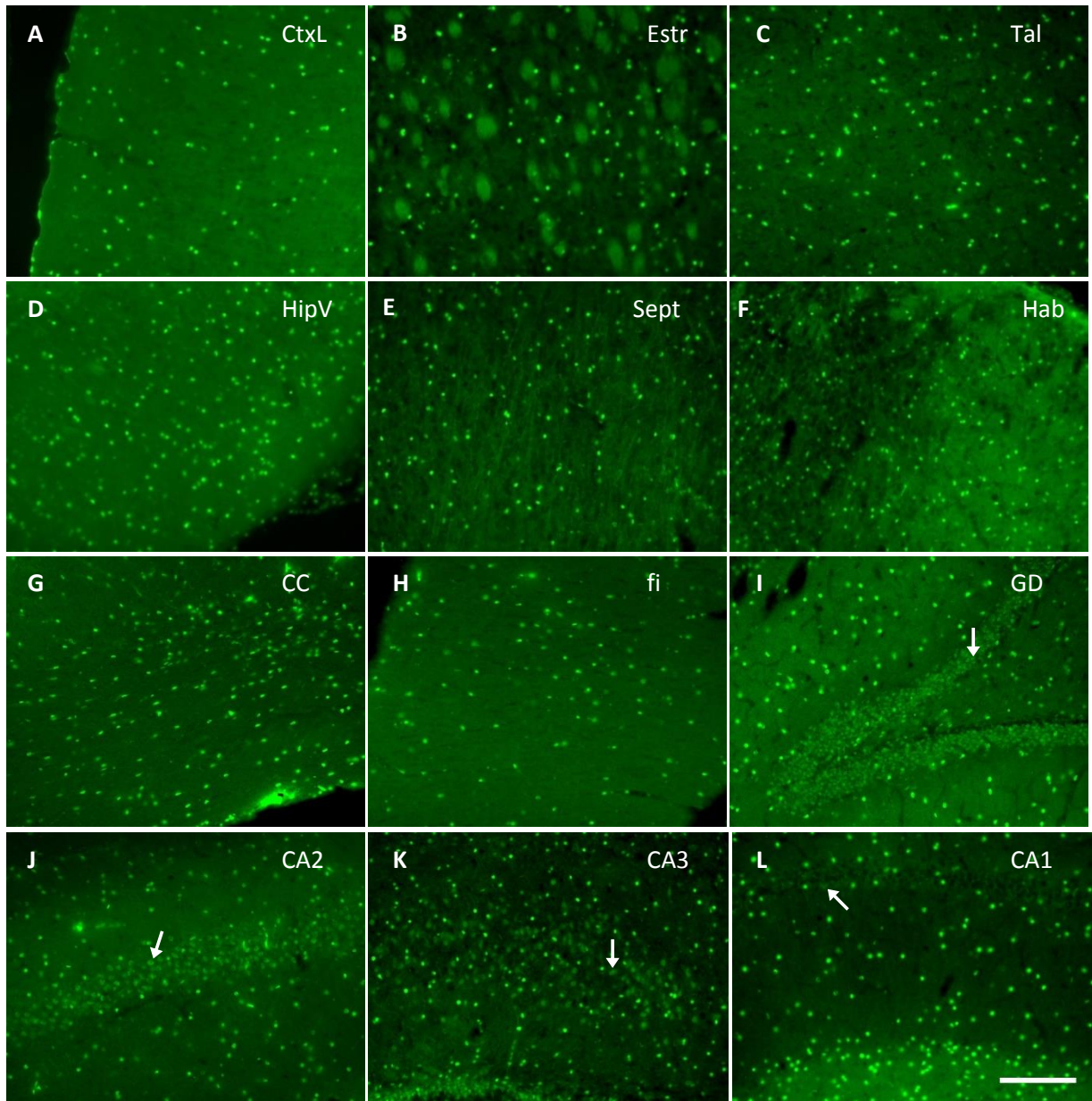


Figura 5.1. Trauma 0h cultivo. Inmunorreactividad para Casp3 “tipo puntos” (A-L) y “tipo neurona” (I-L). La IR tipo puntos, de intensa fluorescencia, se localiza prácticamente en todas las regiones del cerebro; en la gráfica se muestran algunos ejemplos representativos. La IR tipo neurona, de baja fluorescencia, se detecta fácilmente en la capa piramidal y granular del hipocampo (I-L); las flechas señalan ejemplos típicos de esta marcación que se encuentran en la capa granular del giro dentado y en las capas piramidales de CA2, CA3 y CA1. CtxL, corteza lateral; Estr, estriado; Tal, tálamo; HipV, región ventral del hipotálamo; Sept, septum; Hab, habénula; CC, cuerpo calloso; fi, fimbria del hipocampo; GD, giro dentado. Objetivo 20x; barra 150 μ m.

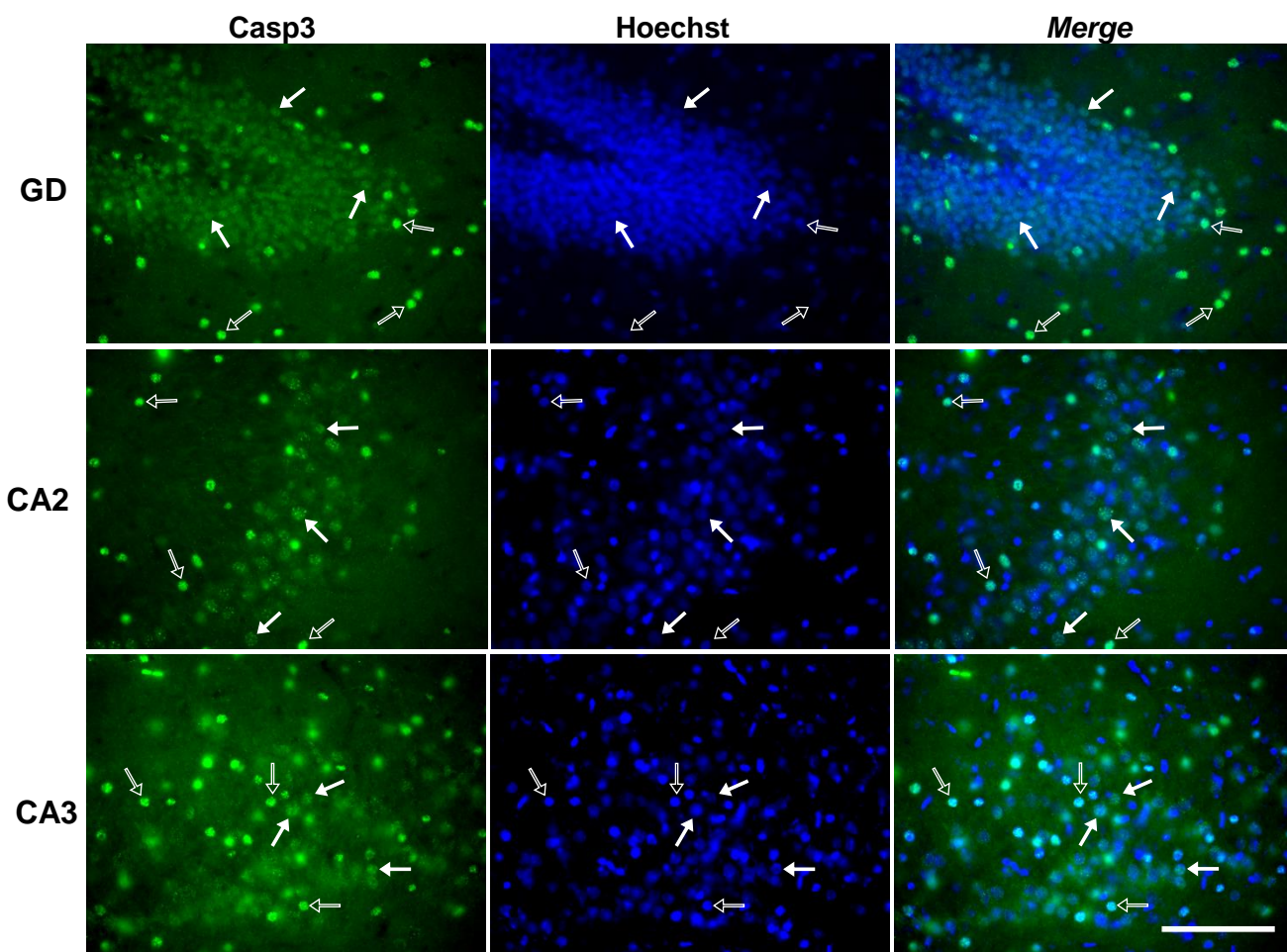


Figura 5.2. Trauma 0h cultivo. Marcación nuclear de Casp3. Las flechas macizas señalan algunos ejemplos de IR tipo neurona; las flechas huecas señalan algunos ejemplos de IR tipo puntos. Los dos tipos de IR se circunscriben al área nuclear. En general los núcleos de las células con IR tipo puntos son más pequeños que los de las células con IR tipo neurona. Solo en el giro dentado los núcleos para ambos tipos de IR parecieran ser de similar tamaño. En la gráfica solo se muestra un ejemplo representativo del hipocampo, no obstante, la marcación nuclear de Casp3 es una característica de todas las regiones del tejido. Objetivo 40x; barra 100 μ m.

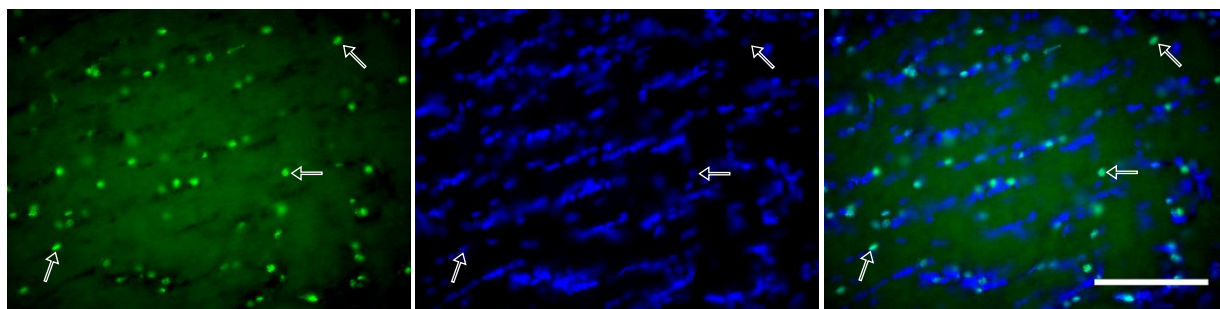


Figura 5.3. Trauma 0h cultivo. Marcación nuclear de Casp3 en cuerpo calloso. En el cuerpo calloso solo está presente la IR tipo puntos y su ubicación 100% nuclear (co-localización con Hoechst) permite descartar la asociación de esta marcación con algún tipo de proceso celular. En el cuerpo calloso, así como también en la cápsula interna y cápsula externa, puede encontrarse IR tipo puntos asociadas a núcleos achatados no circulares. Objetivo 40x; barra 100 μ m.

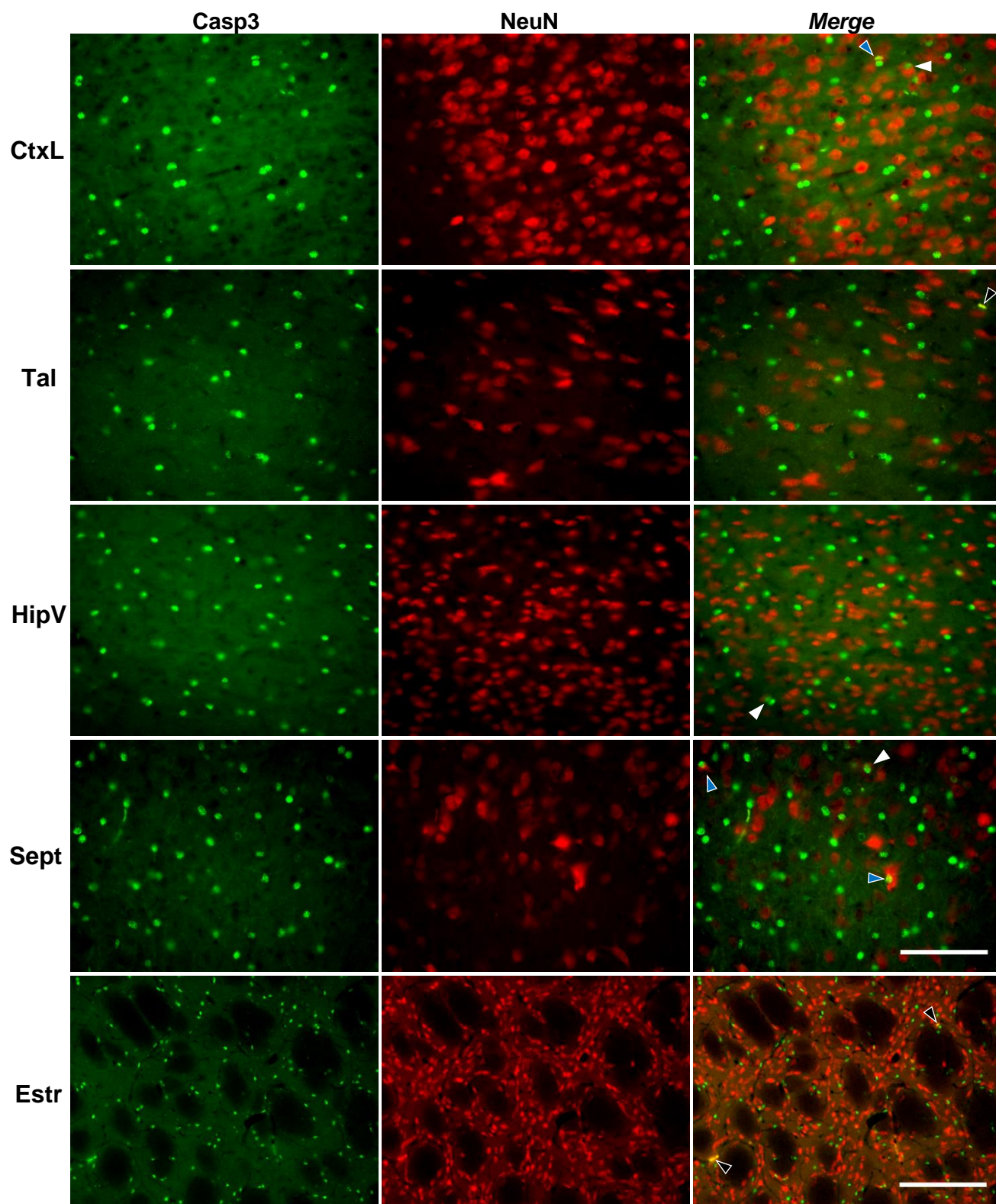


Figura 5.4. Trauma 0h cultivo. Co-localización Casp3 y NeuN para IR tipo puntos. En términos generales la marcación tipo puntos no co-localiza con NeuN. En la gráfica se muestran algunos ejemplos representativos. Apuntador azul: co-localizaciones positivas; apuntador blanco: co-localizaciones falsos positivos, debidas a sobreposición de núcleos (verificadas por marcación con Hoechst); apuntador negro: suciedad fluorescente. CtxL, corteza lateral; Tal, tálamo; HipV, región ventral del hipotálamo; Sept, septum; Estr, estriado. Barra Estr 200 μm (20x), barra otros 100 μm (40x).

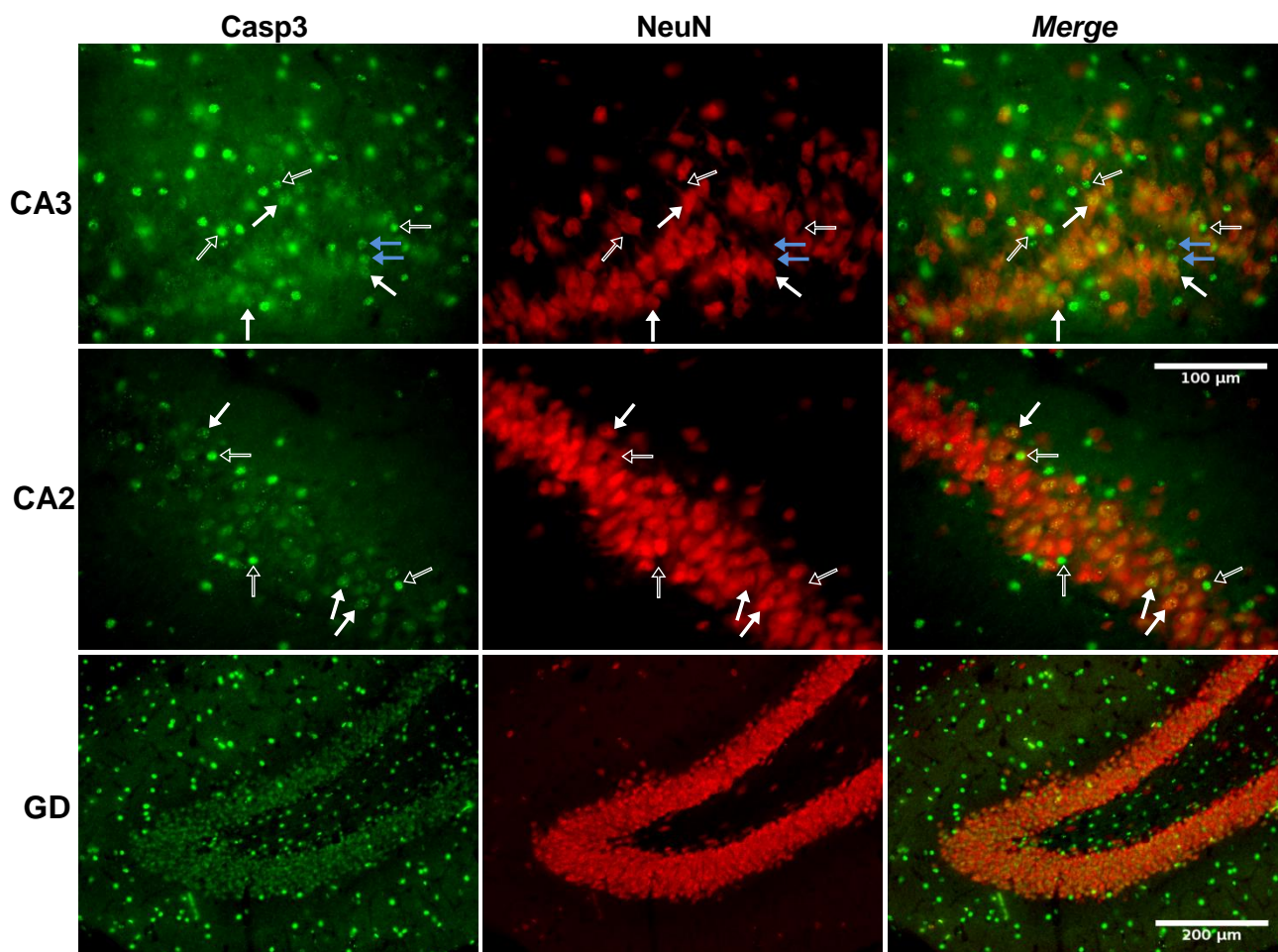


Figura 5.5. Trauma 0h cultivo. Co-localización Casp3 y NeuN en hipocampo. Las flechas macizas señalan algunos ejemplos de IR tipo neurona; las flechas huecas señalan algunos ejemplos de IR tipo puntos. En el hipocampo la marcación de NeuN permite delimitar bien la capa piramidal del *Cornu Ammonis* (en la figura solo se muestra CA3 y CA2 a manera de ejemplo) y la capa granular del giro dentado (GD). La IR tipo neurona co-localiza con NeuN (de allí el nombre otorgado) ubicándose dentro de estas mismas capas. En ocasiones es posible encontrar IR tipo neurona que no co-localiza con NeuN (flechas azules), pero en el presente proyecto estos casos fueron muy raros. La IR tipo puntos también puede presentarse al interior de las capas piramidal y granular, aunque en este caso la co-localización con NeuN fue un evento muy escaso. Objetivo 40x: CA3 y CA2; Objetivo 20x: GD.

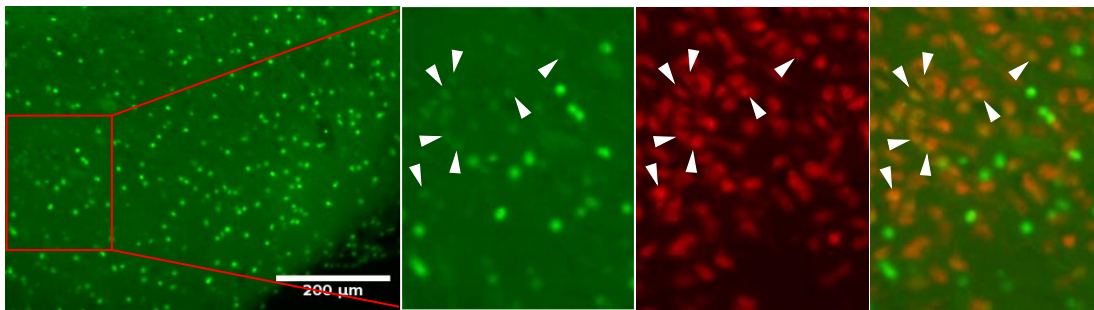


Figura 5.6. Trauma 0h cultivo. IR tipo neurona en regiones diferentes al hipocampo. Empleando el objetivo base de trabajo (20x, ver §4.5) no fue fácil detectar la IR tipo neurona para Casp3 en regiones diferentes al hipocampo; esto debido a la muy baja fluorescencia que presentaron estos casos. Para la gráfica se ha escogido como ejemplo una de [las imágenes donde la](#) IR tipo neurona es más notoria, registrada por fuera del hipocampo. Los apuntadores señalan algunos ejemplos de este tipo de inmunorreactividad para la región tuberal del hipotálamo. Otros sectores como el estriado, el tálamo, la habénula y la corteza cerebral, también presentan este tipo de IR aunque con aún una menor fluorescencia.

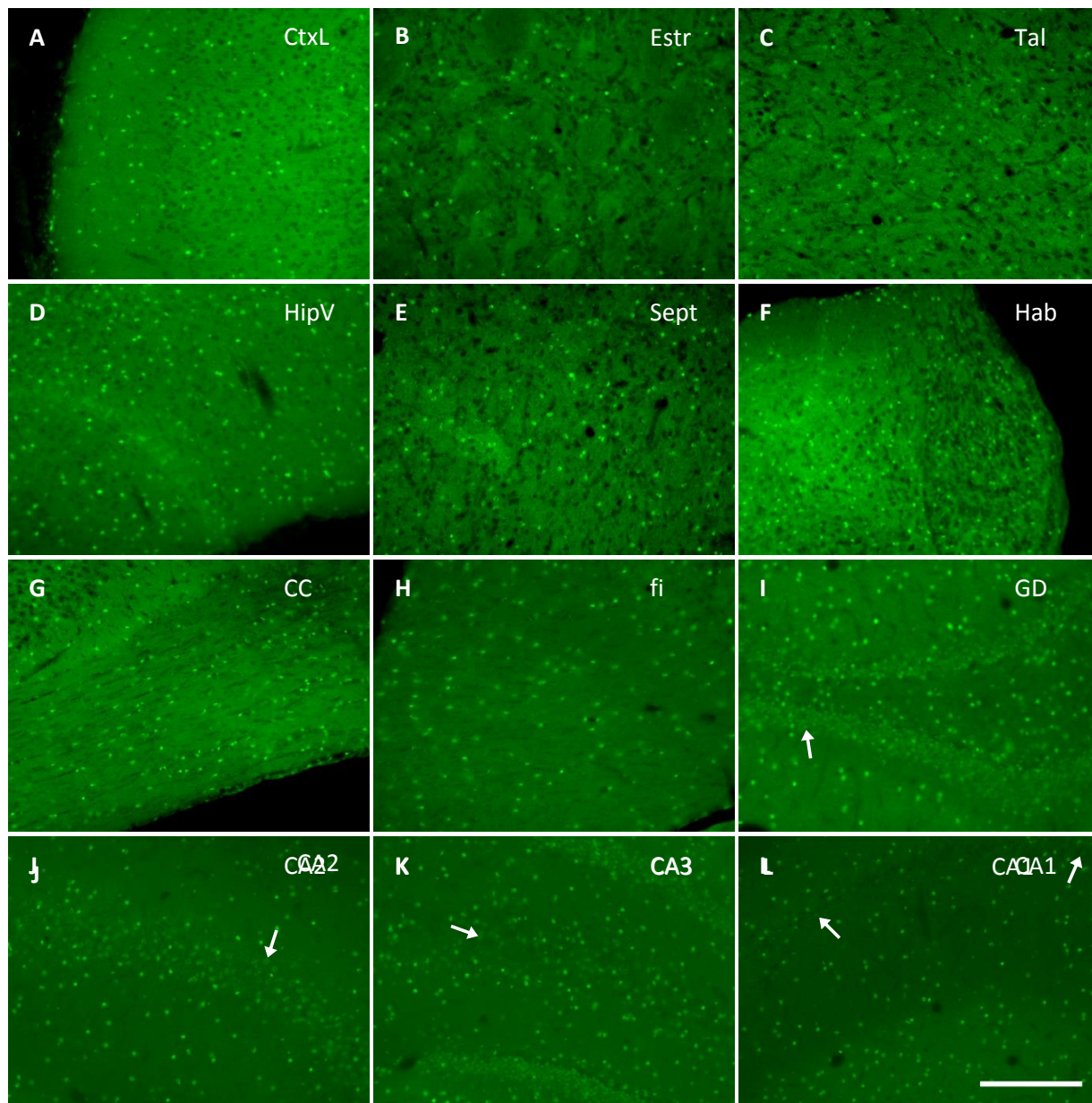


Figura 5.7. Control 0h cultivo. Inmunorreactividad para Casp3 “tipo puntos” (A-L) y “tipo neurona” (I-L). La IR tipo puntos se localiza prácticamente en todas las regiones del cerebro; en la gráfica se muestran algunos ejemplos representativos. La IR tipo neurona se detecta en el hipocampo (I-L); las flechas señalan ejemplos típicos de esta marcación que se encuentran en la capa granular del giro dentado y en las capas piramidales de CA2, CA3 y CA1. Nótese como ambos tipos de marcación están mucho más enmascaradas por la autofluorescencia del tejido en comparación con el grupo trauma (figura 5.1), lo que da cuenta de una menor expresión subcelular de Casp3 en estos controles. CtxL, corteza lateral; Estr, estriado; Tal, tálamo; HipV, región ventral del hipotálamo; Sept, septum; Hab, habénula; CC, cuerpo calloso; fi, fimbria del hipocampo; GD, giro dentado. Objetivo 20x; barra 200 μ m.

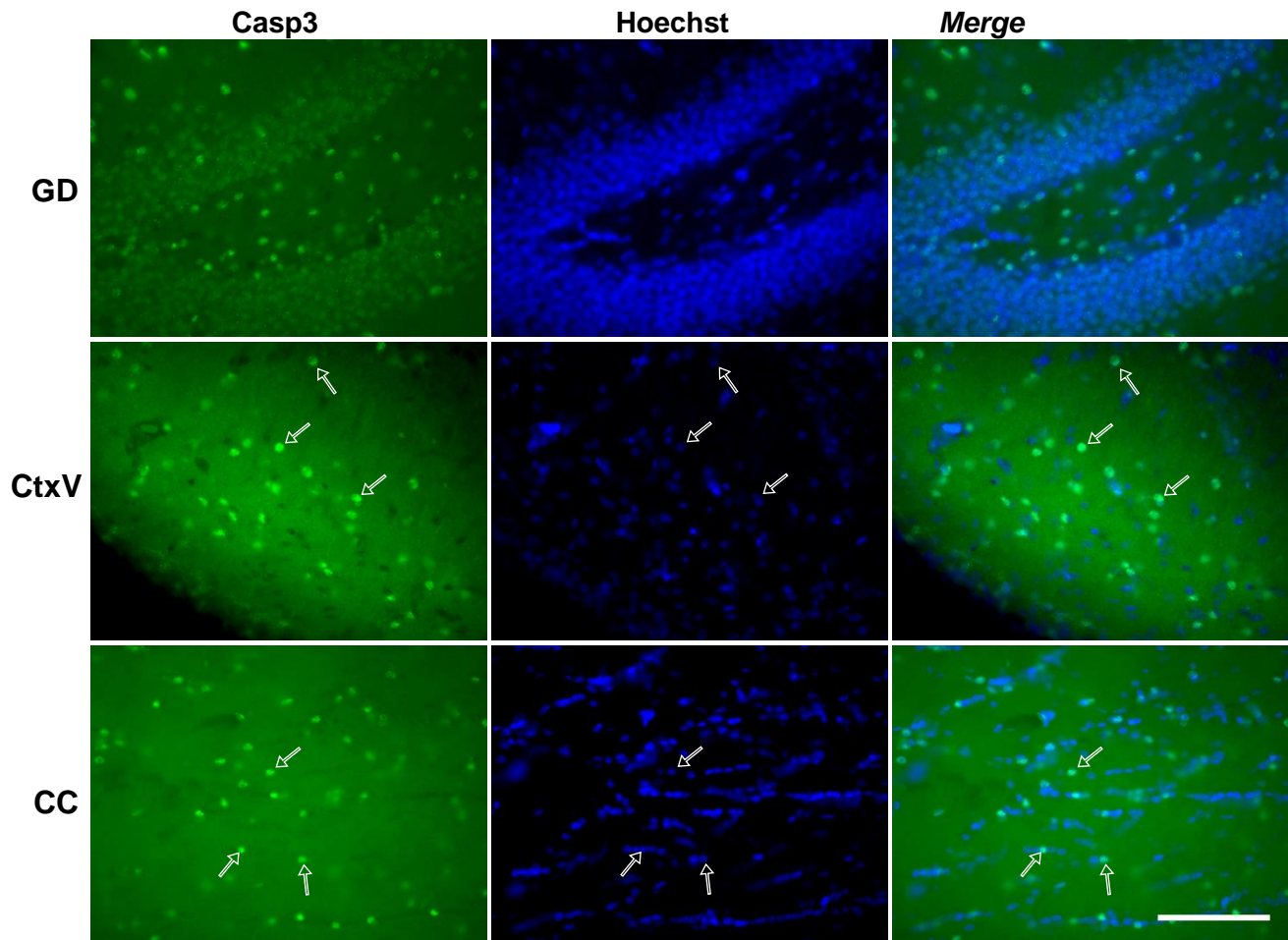


Figura 5.8. Control 0h cultivo. Marcación nuclear de Casp3. En el giro dentado (GD) las células granulares presentan la marcación para Casp3 que hemos denominado IR tipo neurona. En corteza ventral (CtxV) y cuerpo calloso (CC) se aprecia la marcación para Casp3 que hemos denominado IR tipo puntos (las flechas huecas señalan algunos ejemplos). Los dos tipos de IR se circunscriben al área nuclear. En general los núcleos de las células con IR tipo puntos son más pequeños que los de las células con IR tipo neurona. En la gráfica solo se muestra un ejemplo representativo del hipocampo, corteza y cuerpo calloso, no obstante, la marcación nuclear de Casp3 es una característica de todas las regiones del tejido. Objetivo 40x; barra 100 μ m.

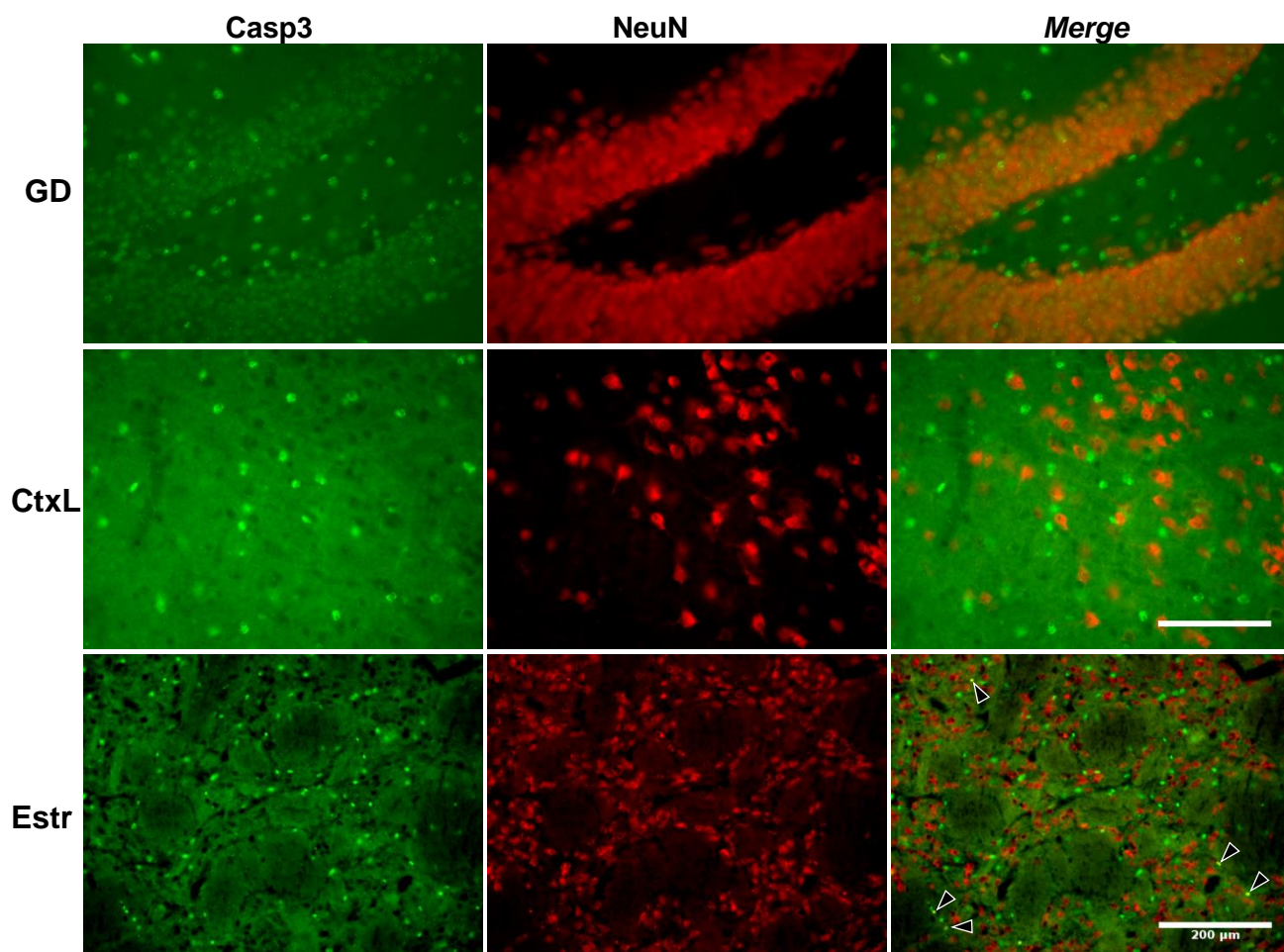
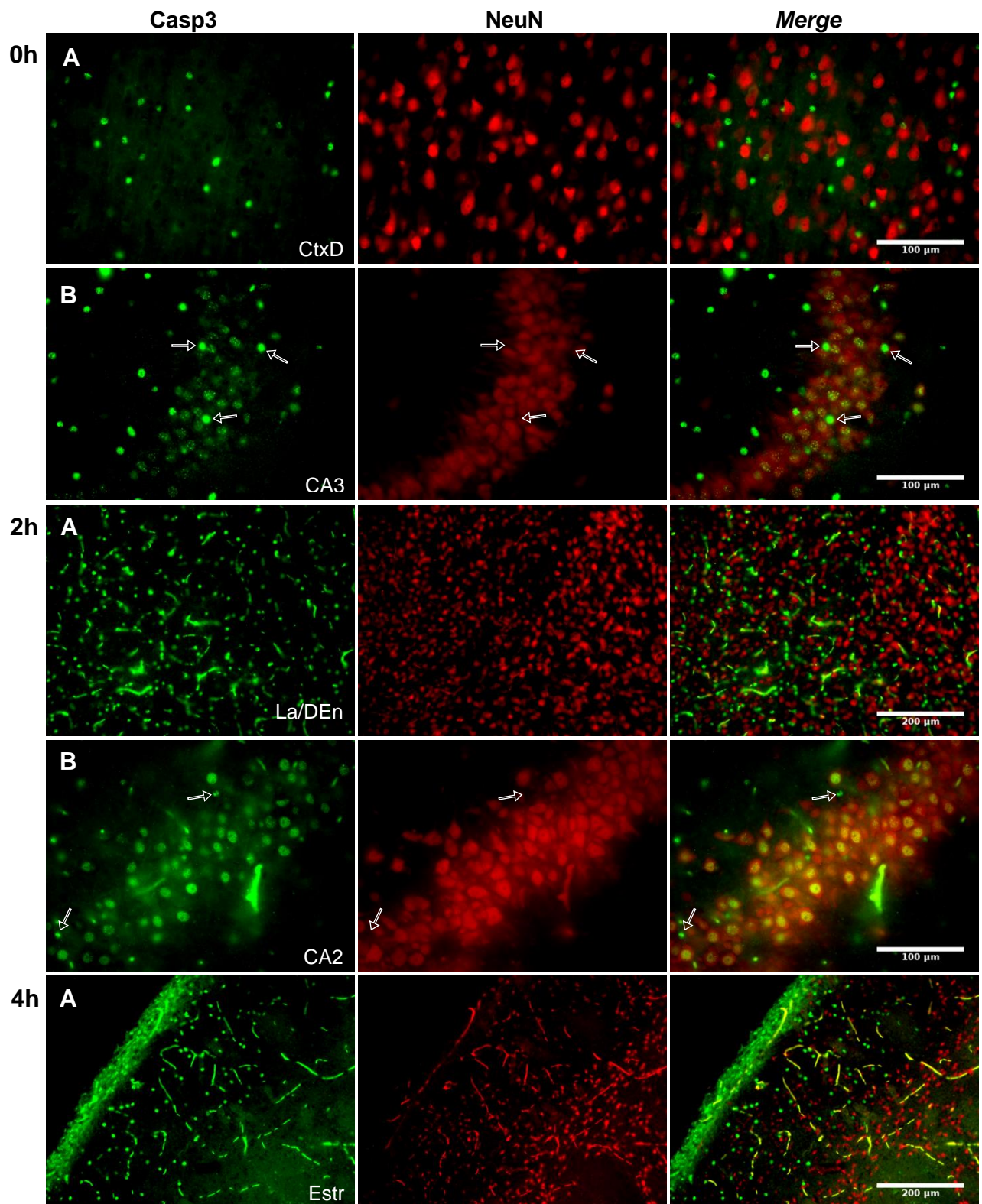


Figura 5.9. Control 0h cultivo. Co-localización Casp3 y NeuN. La IR tipo neurona, detectable en el hipocampo (en la capa piramidal del *Cornu Ammonis* y la capa granular del giro dentado), co-localiza con NeuN (de allí el nombre otorgado). En la gráfica se presenta un ejemplo representativo de esta marcación para el giro dentado (GD). La IR tipo puntos no co-localiza con NeuN. En la gráfica se presenta un ejemplo representativo de esta marcación para la corteza lateral (CtxL) y el estriado (Estr). Apuntador negro: suciedad fluorescente. Objetivo 40x: GD y CtxL, barra 100 μm ; objetivo 20x: Estr.



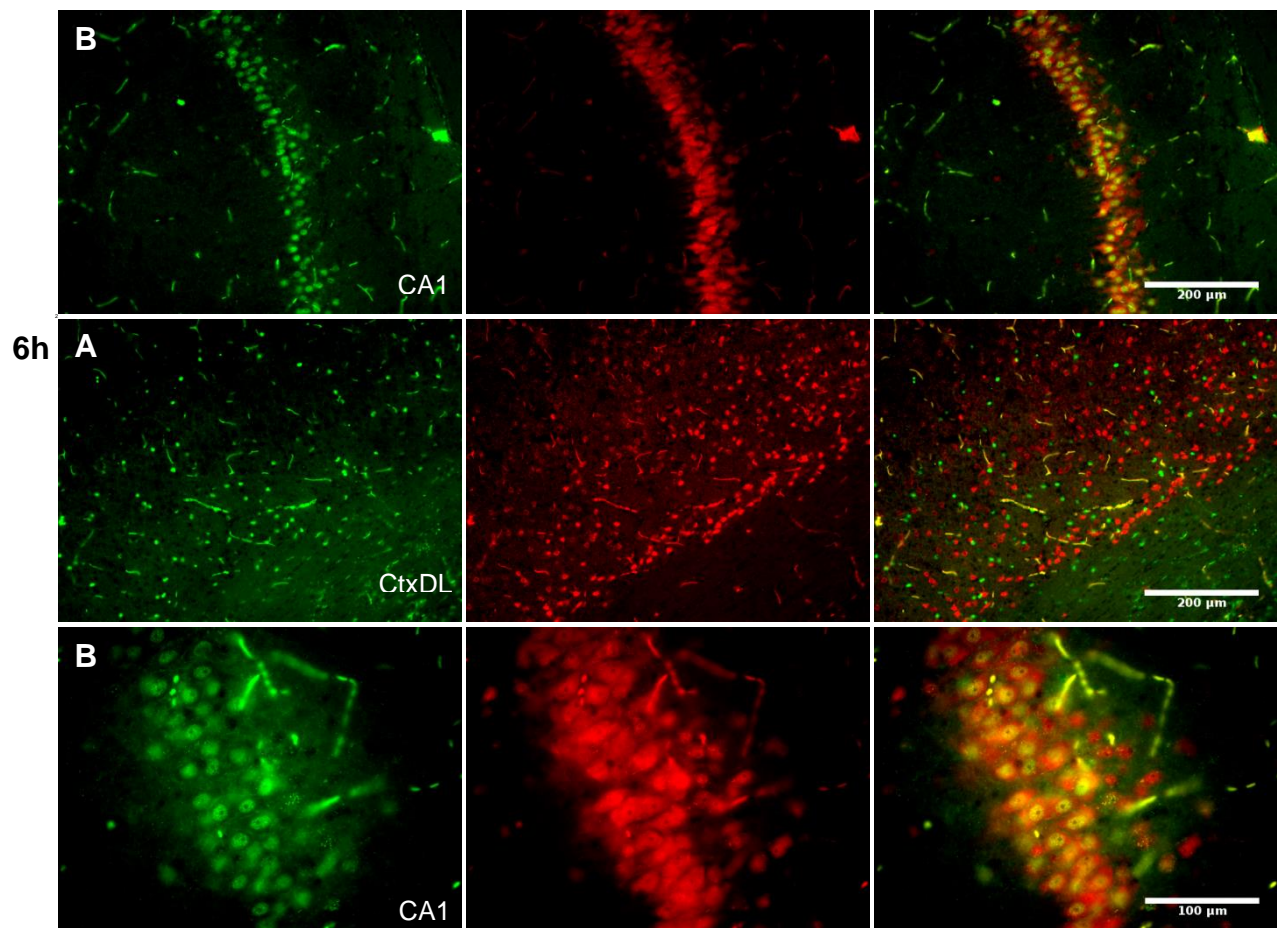


Figura 5.10. Características de la IR tipo puntos e IR tipo neurona a lo largo del cultivo. En la gráfica se muestran ejemplos representativos de la IR tipo puntos (A) y la IR tipo neurona hipocámpal (B) para las diferentes horas de cultivo en trauma. Las flechas indican IR tipo puntos al interior de las capas piramidales y permiten comparar el tamaño de esta marcación con la IR tipo neurona. La IR tipo puntos y la IR tipo neurona mantienen sus características distintivas a lo largo de todo el cultivo, esto es, marcación circular de menor diámetro y no co-localización con NeuN para la IR tipo puntos; y, marcación de mayor diámetro y co-localización nuclear con NeuN para la IR tipo neurona. La autofluorescencia de capilares se aprecia para los tejidos en cultivo. En la gráfica se ha manipulado el contraste de las imágenes para facilitar la evaluación de la co-localización. CtxD, corteza dorsal; La, núcleo lateral de la amígdala; DEn, núcleo dorsal endopiriforme; Estr, estriado; CtxDL, región dorsolateral de la corteza.

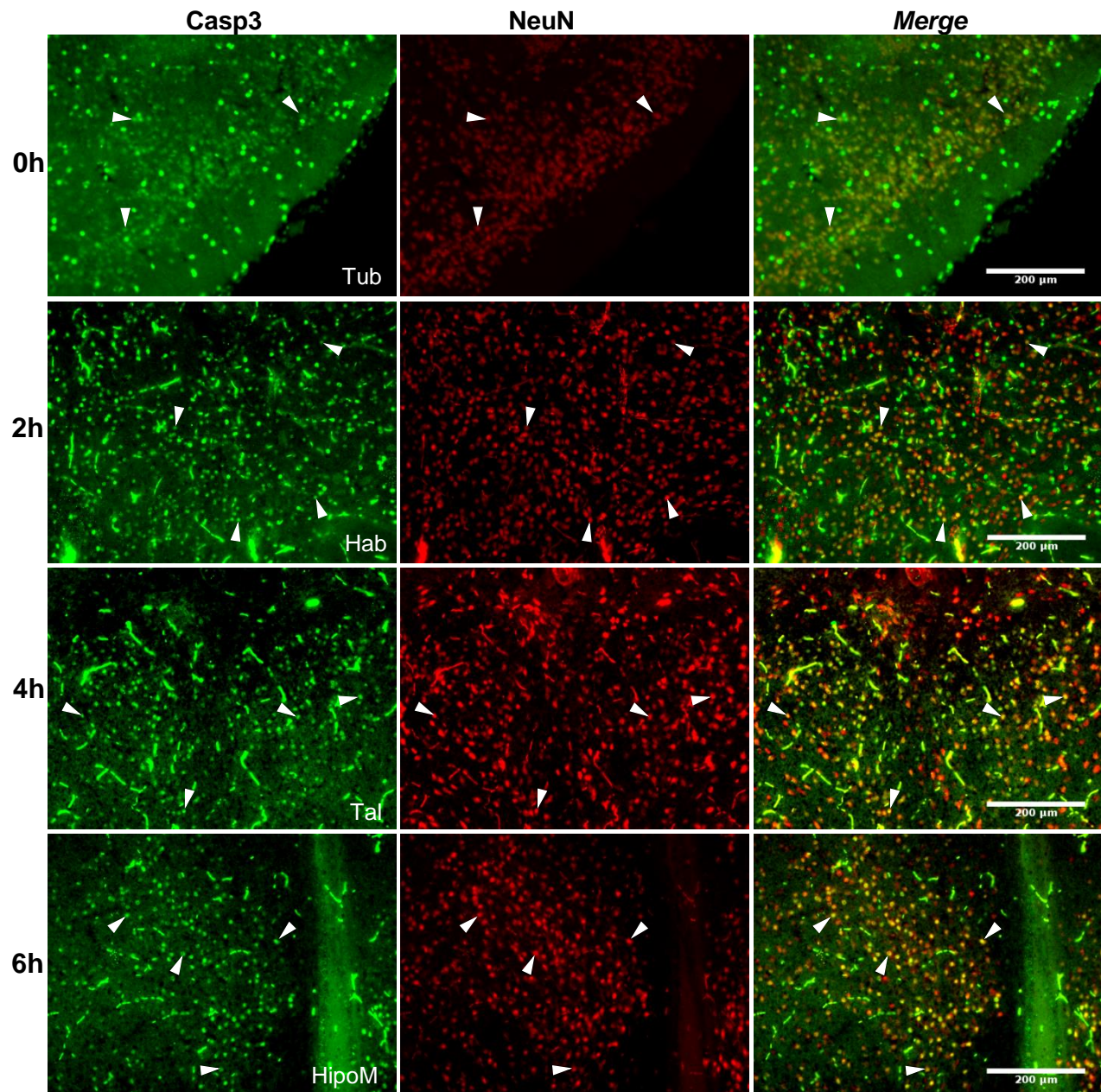
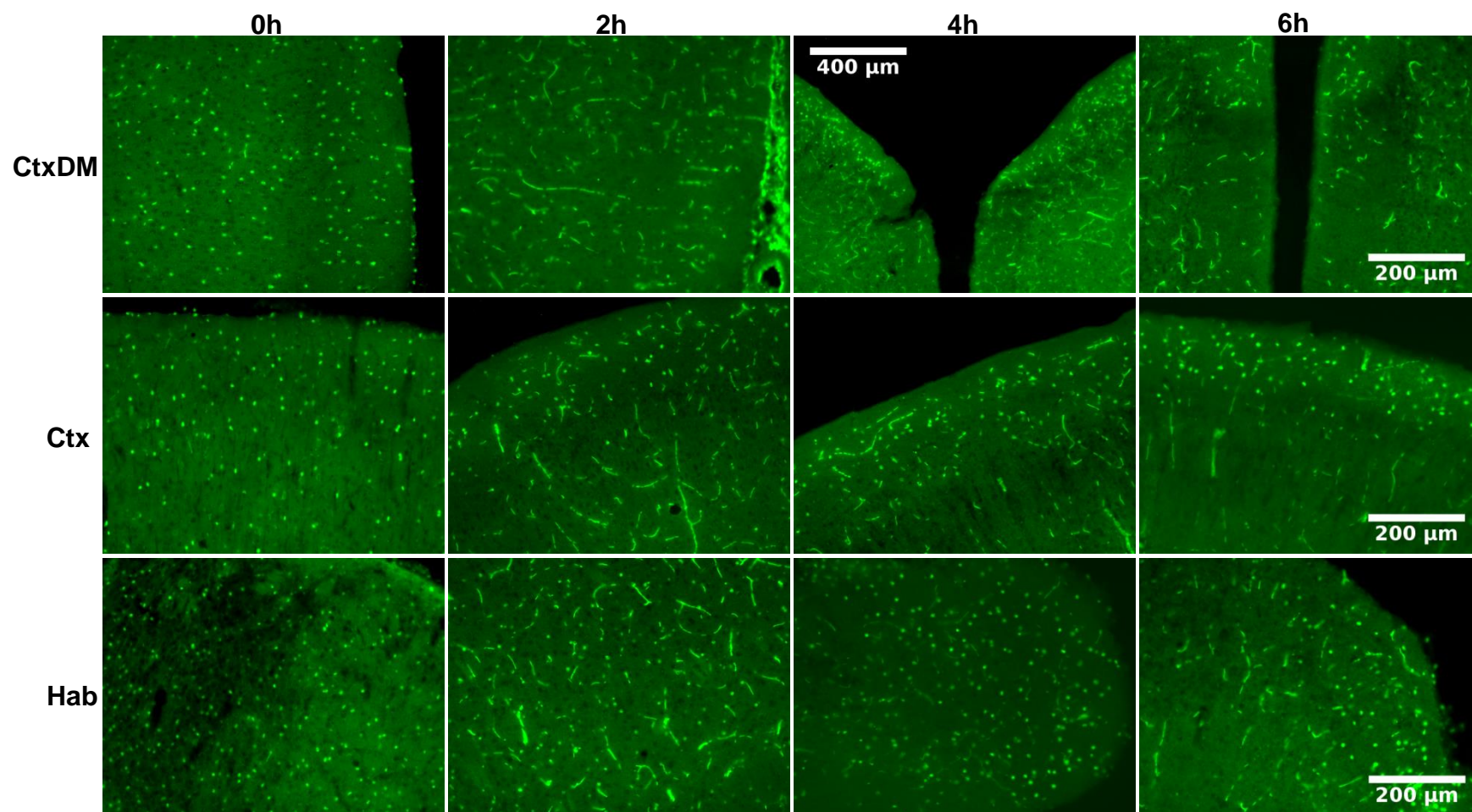


Figura 5.11. IR tipo neurona en sectores diferentes al hipocampo a lo largo del cultivo. En general la IR tipo neurona por fuera del hipocampo exhibió a lo largo del cultivo una muy baja fluorescencia que dificultó su detección. En la gráfica, se muestran algunos ejemplos representativos en trauma sometidos a alto contraste para facilitar la visualización. Notar que en las imágenes de alto contraste para Casp3 se hace imposible distinguir la IR tipo puntos de la tipo neurona (en 0h el contraste se hizo moderado); tal distinción se efectúa en las imágenes originales. Las cabezas de flecha señalan algunos ejemplos de la marcación tipo neurona. Tub, tubérculo olfatorio; Hab, habénula; Tal, tálamo; HipoM, hipotálamo medial.



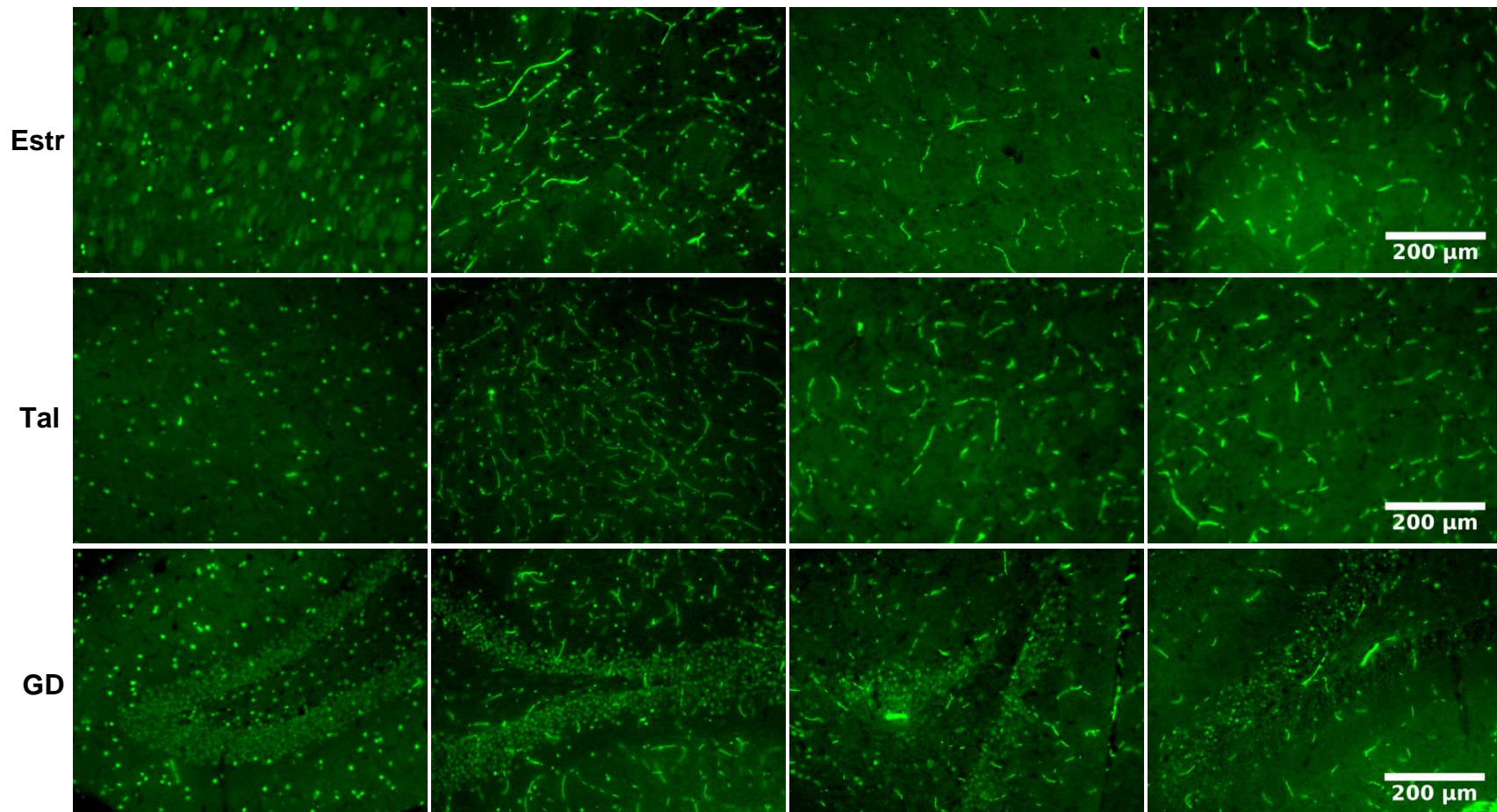


Figura 5.12. Cambios en la marcación de Casp3 a lo largo del cultivo. En la gráfica se muestran algunos ejemplos representativos de los cambios globales en la marcación de Casp3 para trauma. Cualitativamente no parecen haber muchas diferencias con la evolución de los controles. En la corteza dorsomedial (CtxDM) a las 2h de cultivo la IR tipo puntos cae drásticamente para luego desaparecer a las 4h, mientras que a partir de este tiempo en el resto de la corteza (Ctx) solo se presenta la marcación en la lámina 1. En la habénula (Hab) la IR tipo puntos disminuye con el tiempo y desde las 4h solo se localiza en el núcleo medial. En el estriado (Estr) y el tálamo (Tal) la densidad de la IR tipo puntos a las 2h de cultivo parece no cambiar mucho, sin embargo la marcación luce de menor diámetro. En estas regiones a partir de las 4h esta marcación desaparece. En el hipocampo la IR tipo puntos después de 2h de cultivo se nota disminuida en número y en diámetro; para las 4h prácticamente desaparece. La IR tipo neurona en el hipocampo, como se aprecia para el giro dentado (GD), muestra buena marcación hasta las 2h de cultivo, y a partir de allí decrece con el tiempo.

5.4 RESULTADOS CUANTITATIVOS

Las observaciones cualitativas permitieron establecer como blancos del análisis cuantitativo a la IR tipo neurona, referida solo a las capas piramidal y granular del hipocampo, y a la IR tipo puntos, referida al tejido nervioso en general.

La obtención de registros confiables para los análisis cuantitativos de la IR tipo neurona por fuera del hipocampo, se vio afectada por la dispersa y baja fluorescencia que en términos generales presentó esta marcación. Estas peculiaridades conllevan a mayores tiempos de búsqueda y enfoque para las áreas de interés dentro del tejido, y así a un mayor deterioro inducido por *photobleaching*. Por tal motivo, la IR tipo neurona por fuera del hipocampo fue omitida de estos análisis.

En los gráficos que en esta sección se presentarán, las diferencias significativas se han indicado con asteriscos sobre barras horizontales de comparación entre grupos, adoptando la siguiente convención: $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. El color verde denota las comparaciones entre los grupos control; el color rojo denota las comparaciones entre los grupos trauma; el color negro denota las comparaciones entre los grupos control y trauma para un tiempo específico de cultivo. El símbolo \circ sobre una línea de señalización (pequeña línea vertical) de la barra de comparación indica el grupo que está siendo comparado, mientras las demás líneas de señalización indican los grupos contra los cuales se está haciendo esta comparación. Una sola marcación de asterisco(s) sobre la barra de comparación (marcación global) indica que ese valor de p cubija a todas las comparaciones en mención; valores diferentes de p se denotan entre paréntesis sobre la respectiva línea de señalización, o sin paréntesis cuando no se hace uso de la marcación global.

5.4.1 Inmunorreactividad en el hipocampo para Casp3 y NeuN

Para el presente análisis los cortes coronales a la altura del hipocampo se seleccionaron de entre los bregmas -2.52 mm y -4.08 mm, empleando como referencia el atlas estereotáxico (Paxinos & Watson, 2007).

La región de interés seleccionada para el sector CA2 se designó como CA2-3 dada la dificultad en establecer, con las marcaciones empleadas, el límite preciso entre CA2 y CA3. Por ello se adoptó como este límite al punto de inflexión de la capa piramidal de CA3 en su transición hacia CA2. El límite CA2-CA1 se determinó evaluando el cambio morfológico en la transición de una estructura a la otra.

La autofluorescencia de capilares en la banda de emisión del Alexa Fluor 488 (figura 5.12), sonda empleada para el marcaje de Casp3, impidió obtener una medida fiable para la inmunorreactividad de Casp3 en las capas piramidal y granular del hipocampo. Por esta razón se hizo uso aquí de ensayos auxiliares de inmunohistoquímica (figura 5.13, A) y el computo de IR por densidad óptica relativa (ver Materiales y Métodos §4.5.2). En la banda de emisión del Alexa Fluor 594, sonda empleada para el marcaje de NeuN, se presentó una buena relación señal/background (figura 5.13, B), lo que permitió contrarrestar la autofluorescencia de capilares simplemente con el proceso de corrección por *background* (ver Materiales y Métodos §4.5.2).

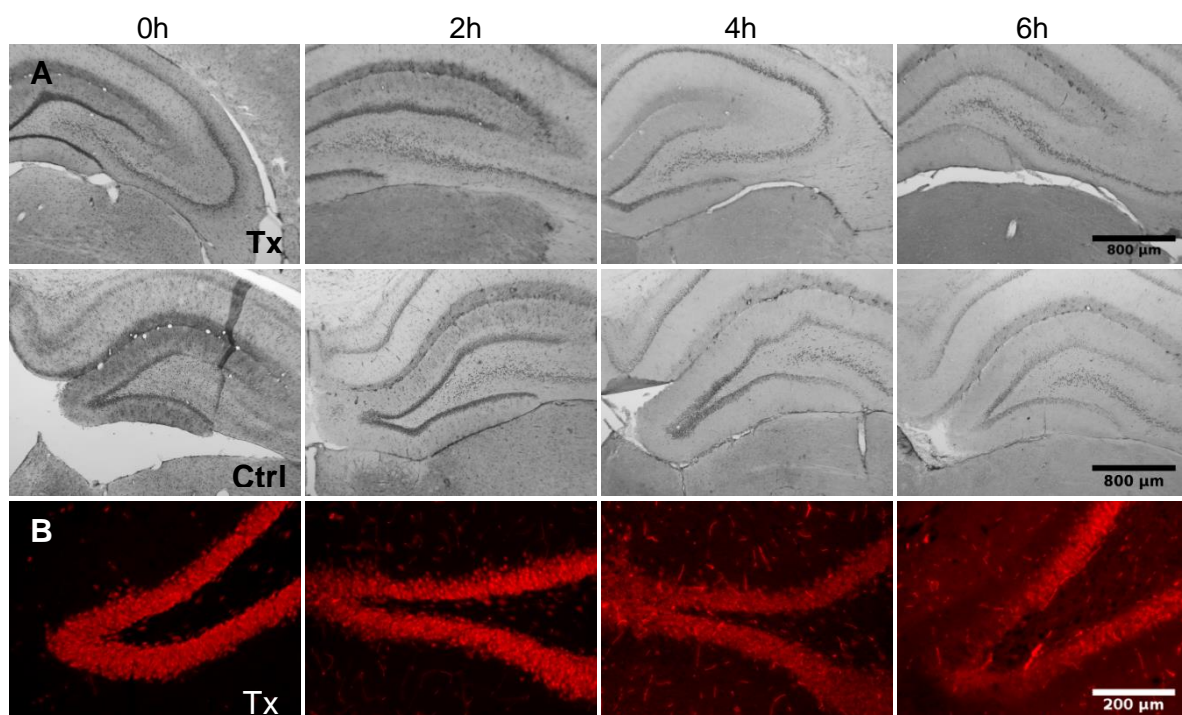


Figura 5.13. Inmunohistoquímica e inmunofluorescencia empleada en el cálculo de la inmunorreactividad en el hipocampo. En la gráfica se muestran ejemplos representativos de las diferentes horas de cultivo. A: inmunohistoquímica para Casp3 (Tx: imágenes centradas en CA3; Ctrl: imágenes centradas en el giro dentado; objetivo 4x). B: inmunofluorescencia para NeuN (imágenes de la cresta del giro dentado, objetivo 20x).

Inmunorreactividad para Casp3

Giro Dentado: las muestras de trauma experimentaron una disminución en la expresión de Casp3 conforme avanzó el tiempo de cultivo hasta las 4h. Entre las 4h y las 6h no se presentó diferencia estadísticamente significativa. A las 0h la IR fue más elevada en comparación con las 2h, 4h y 6h ($p < 0.05$); a las 2h la IR fue más elevada en comparación con las 4h y 6h ($p < 0.05$). Los controles mostraron una dinámica algo diferente, con un incremento en la expresión de Casp3 a las 2h de cultivo ($p < 0.05$), y a partir de allí un decaimiento en la IR ($p < 0.05$) que estuvo por debajo de su valor a las 0h ($p < 0.05$), y sin diferencia significativa entre las 4h y las 6h. Respecto a los controles, la expresión de Casp3 en trauma mostró diferencias estadísticamente significativas para las 0h ($p < 0.05$) y las 2h ($p < 0.05$) de cultivo.

CA3: las muestras de trauma exhibieron un incremento en la expresión de Casp3 a las 2h de cultivo ($p < 0.05$), y a partir de allí una disminución en la IR ($p < 0.05$) sin diferencias significativas entre las 4h y 6h, ni tampoco con el nivel de expresión de Casp3 mostrado a las 0h. Los controles mostraron la misma tendencia, con un aumento en la expresión de Casp3 a las 2h de cultivo ($p < 0.05$) y a partir de allí una disminución en la IR; sin embargo no presentó diferencias significativas entre las 4h y 6h. A pesar de la tendencia de la IR al decremento después de las 2h, esta, o bien fue mayor que a las 0h (comparación con 4h,

$p < 0.05$) o no tuvo diferencias con el tiempo cero (comparación con 6h). Respecto a los controles, la expresión de Casp3 en trauma no mostró diferencias estadísticamente significativas.

CA2-3: en este sector no se determinaron diferencias estadísticamente significativas para los cambios en la expresión de Casp3, ni entre las muestras, tanto de los grupos trauma como de los grupos control, para los diferentes tiempos de cultivo, ni tampoco entre trauma y control para cada tiempo particular. No obstante, tanto las muestras de trauma como las de control exhiben una tendencia similar de aumento en la expresión de Casp3 a las 2h de cultivo, seguido de una disminución en la Casp3-IR para las 4h y 6h, la cual continua siendo en promedio similar a los niveles de IR para las 0h.

CA1: las muestras de trauma exhibieron un incremento en la expresión de Casp3 a las 2h de cultivo ($p < 0.05$), y a partir de allí una disminución en la IR ($p < 0.05$) sin diferencias significativas entre las 4h y 6h, ni tampoco con el nivel de expresión de Casp3 mostrado a las 0h. Los controles mostraron la misma dinámica, con un aumento en la Casp3-IR a las 2h ($p < 0.05$) y a partir de allí una tendencia al decrecimiento; sin embargo, no asoció diferencias significativas. A pesar de esta tendencia, la expresión de Casp3 después de las 2h continua siendo mayor a la calculada para las 0h ($p < 0.05$). Respecto a los controles, la expresión de Casp3 en trauma presentó diferencias a las 0h, las 2h y las 6h de cultivo ($p < 0.05$).

El grado de similitud de las variaciones en la expresión de Casp3 entre los diferentes sectores del hipocampo fue evaluado mediante los coeficientes de correlación de Pearson y de Spearman. Ambos coeficientes se computaron sobre los valores promedio de IR que se muestran en la figura 5.14 (Tabla 5.1). Este análisis mostró que los grupos control en el giro dentado y CA2-3 comparten una dinámica similar en la expresión de Casp3 a lo largo del cultivo ($r = 0.94$, $r_s = 1.00$); asimismo los grupos control en CA3 y CA1 ($r = 0.96$, $r_s = 1.00$) (figura 5.15, A). Por su parte, para las muestras del grupo trauma, solamente en el giro dentado se evidenció una dinámica distinta en la Casp3-IR; en el resto de sectores las correlaciones fueron altas (figura 5.15, B).

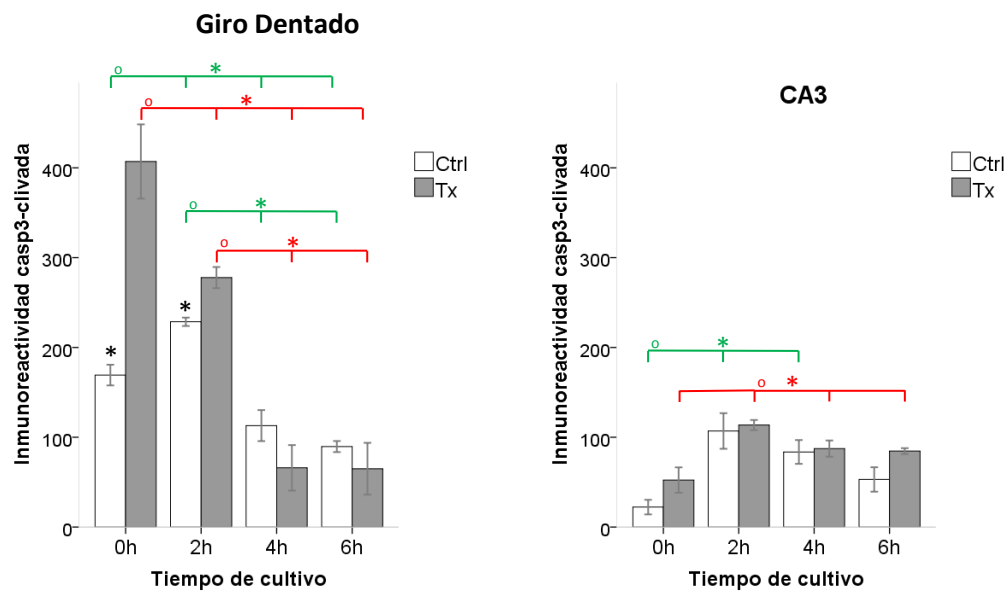


Figura 5.14.

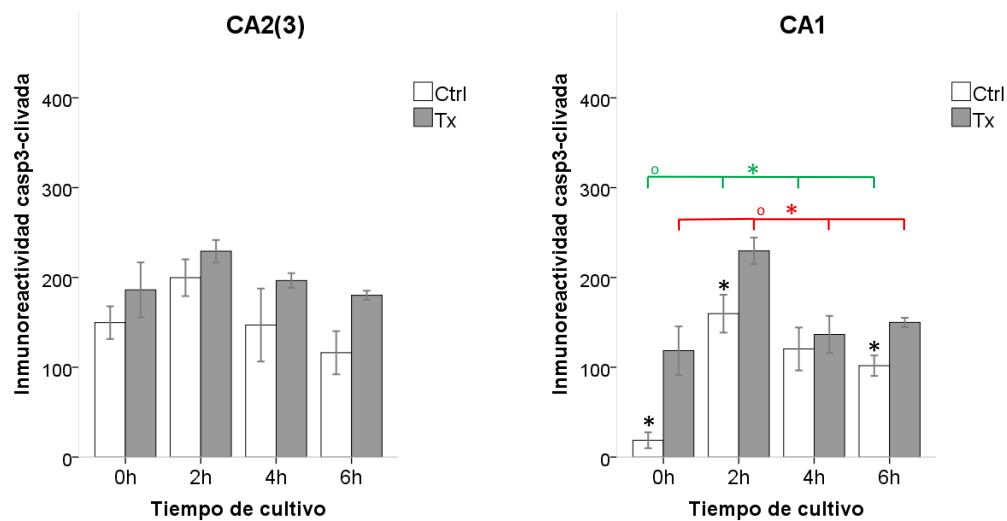


Figura 5.14. Inmunorreactividad, por densidad óptica relativa, para Casp3 en la capa piramidal y granular del hipocampo.

Tx	GD	CA3	CA2-3	CA1
GD	1.00	$r = -0.378$ $r_s = -0.20$	$r = 0.236$ $r_s = 0.40$	$r = 0.054$ $r_s = -0.40$
CA3	$r = -0.378$ $r_s = -0.20$	1.00	$r = 0.778$ $r_s = 0.80$	$r = 0.892$ $r_s = 0.80$
CA2-3	$r = 0.236$ $r_s = 0.40$	$r = 0.778$ $r_s = 0.80$	1.00	$r = 0.895$ $r_s = 0.40$
CA1	$r = 0.054$ $r_s = -0.40$	$r = 0.892$ $r_s = 0.80$	$r = 0.895$ $r_s = 0.40$	1.00
Ctrl	GD	CA3	CA2-3	CA1
GD	1.00	$r = 0.365$ $r_s = 0.40$	$r = 0.940$ $r_s = 1.00$	$r = 0.205$ $r_s = 0.40$
CA3	$r = 0.365$ $r_s = 0.40$	1.00	$r = 0.636$ $r_s = 0.40$	$r = 0.965$ $r_s = 1.00$
CA2-3	$r = 0.940$ $r_s = 1.00$	$r = 0.636$ $r_s = 0.40$	1.00	$r = 0.466$ $r_s = 0.40$
CA1	$r = 0.205$ $r_s = 0.40$	$r = 0.965$ $r_s = 1.00$	$r = 0.466$ $r_s = 0.40$	1.00

Tabla 5.1. Matriz de coeficientes de correlación para los valores promedio de Casp3-IR en el hipocampo. r : coeficiente de Pearson; r_s : coeficiente de Spearman. El empleo de ambos coeficientes permite evaluar simultáneamente relaciones lineales (Pearson) y monótonas (Spearman) entre los cambios en la expresión de Casp3 en el hipocampo.

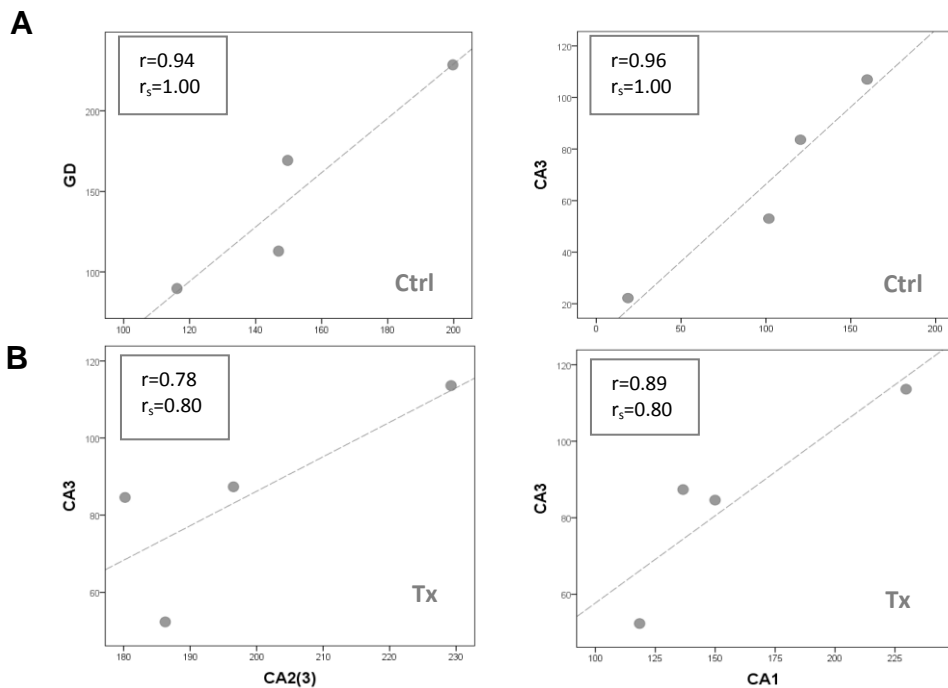


Figura 5.15. Diagramas de dispersión para la Casp3-IR entre las áreas del hipocampo con mayor similitud en su dinámica. A: grupo control; B: grupo trauma. r : coeficiente de Pearson; r_s : coeficiente de Spearman.

Inmunorreactividad para NeuN

Giro Dentado: las muestras de trauma exhibieron un decrecimiento gradual en la NeuN-IR conforme avanzó el tiempo de cultivo, decrecimiento que para las 4h se hizo significativo con respecto al tiempo cero ($p<0.001$). La NeuN-IR a las 2h fue más elevada que a las 4h ($p<0.01$), y esta a su vez más elevada que a las 6h ($p<0.05$). Los controles presentaron la misma reducción en la IR con el aumento del tiempo de cultivo, y al igual que trauma, las primeras 2h no mostraron diferencias significativas respecto de las 0h; estas diferencias se establecieron transcurridas 4h de cultivo ($p<0.05$). Entre las 4h y las 6h, los controles registraron una disminución en la IR promedio; sin embargo los análisis no estimaron significativa esta diferencia. Respecto a los controles, la expresión de NeuN en trauma mostró una reducción significativa (del 27%) solo para las 0h ($p<0.05$), aunque para los demás tiempos de cultivo también mantuvo en promedio un valor más bajo.

CA3: la disminución en la NeuN-IR con el aumento del tiempo de cultivo fue una característica compartida entre todas las regiones del hipocampo. En las muestras de trauma para CA3, a las 2h de cultivo se presentó una pérdida de NeuN-IR del 20% ($p<0.05$). El paso de las 2h a las 4h significó el cambio más abrupto en la merma de IR para NeuN; a las 4h trauma exhibió una pérdida del 80% de la NeuN-IR respecto de la exhibida a las 2h ($p<0.001$). El nivel de IR alcanzado a las 4h se mantuvo hasta las 6h de cultivo. Los controles presentaron un decremento similar a las muestras de trauma en la NeuN-IR, sin embargo, en las primeras 2h aunque el promedio cayó un 15%, esta diferencia no resultó significativa. A las 4h la pérdida de NeuN-IR fue del 82% respecto de las 2h ($p<0.001$). Al igual que para trauma, los niveles bajos de IR alcanzados a las 4h se mantuvieron hasta las 6h. Respecto a los controles, la expresión de NeuN en trauma mostró una reducción significativa (del 25%) solo para las 2h ($p<0.05$); no obstante, a las 0h la NeuN-IR para trauma resultó en promedio 19% más baja que el control.

CA2-3: las muestras de trauma en las primeras 2h de cultivo no registraron diferencias significativas en la IR para NeuN. A las 4h la expresión cayó un 70% respecto de las 2h ($p<0.01$), nivel que se mantuvo sin cambios significativos hasta las 6h de cultivo. Los controles exhibieron la misma dinámica que los tejidos con trauma en la NeuN-IR, con una reducción a las 4h de cultivo del 73% respecto de las 2h ($p<0.01$). Respecto a los controles, las muestras de trauma no mostraron diferencias estadísticamente significativas para ningún tiempo de cultivo; sin embargo, durante las 2 primeras horas la IR promedio de los controles estuvo por encima de la de los tejidos con trauma.

CA1: las muestras para trauma mostraron una reducción promedio del 20% de NeuN-IR a las 2h de cultivo; sin embargo, no resultó estadísticamente significativa esta diferencia. La pérdida de IR a las 4h fue del 71% respecto de las 2h ($p<0.001$), y se mantuvo así hasta las 6h de cultivo. En los controles, a las 2h de cultivo la IR descendió 30% ($p<0.05$), y luego a las 4h descendió 73% respecto del tiempo anterior ($p<0.01$); a las 6h la IR se mantuvo en los mismos niveles de las 4h. Respecto a los controles, la expresión de NeuN en trauma mostró una reducción significativa (del 22%) solo para las 0h ($p<0.05$). Es de notar que, aunque sin significancia estadística, para las 2h el nivel promedio en la IR de los tejidos traumatizados estuvo un 11% por debajo de los controles.

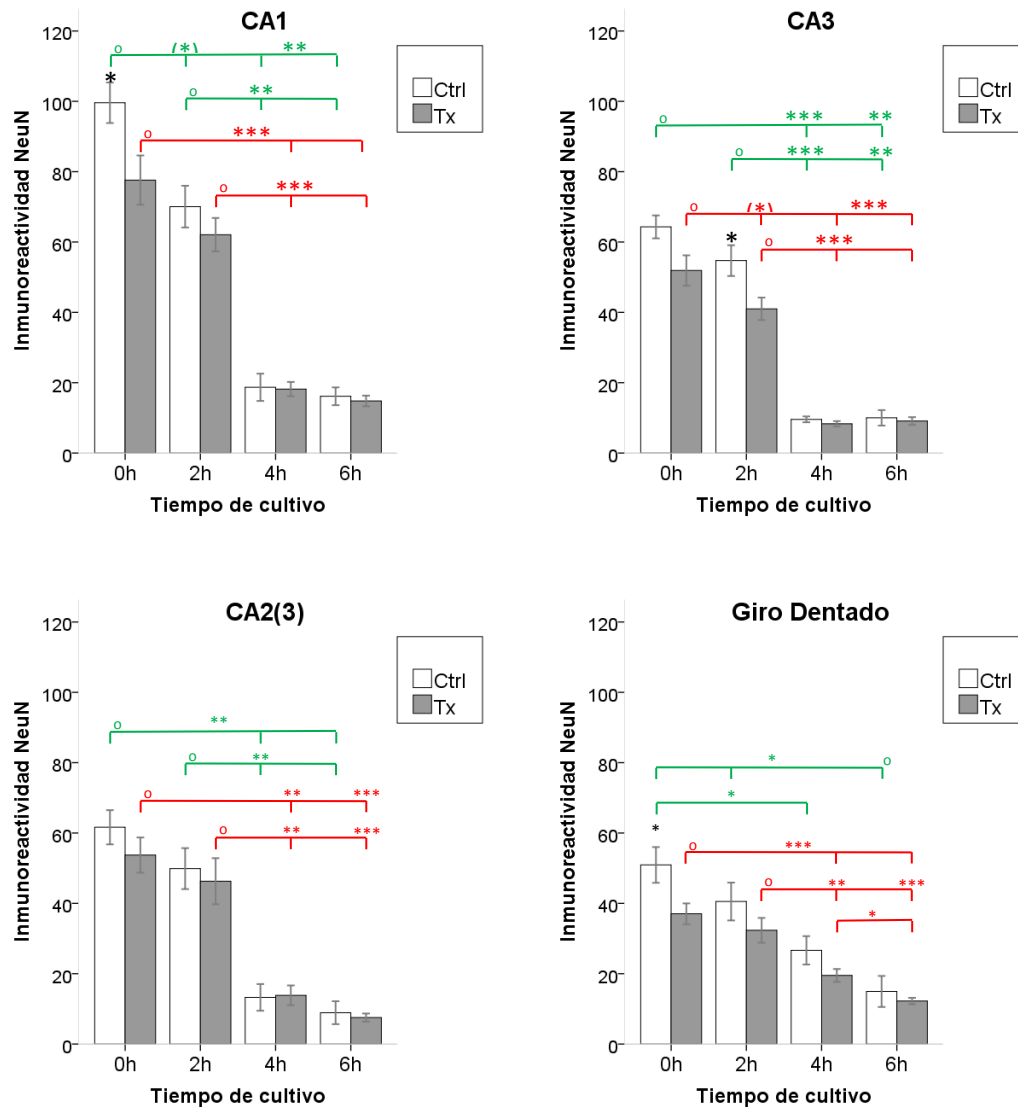


Figura 5.16. Inmunorreactividad, por valor de pixel, para NeuN en la capa piramidal y granular del hipocampo. Las gráficas se han ordenado de acuerdo con el nivel de expresión de NeuN para el tiempo 0h.

5.4.2 Área nuclear en el hipocampo

Los cambios morfológicos que experimentan las células pueden ser indicadores del tipo de procesos degenerativos subyacentes. Con esto en mente, y como complemento a los análisis de inmunorreactividad en el hipocampo, en este proyecto se evaluó el cambio en el tamaño nuclear para las células, medido como área nuclear planimétrica, de las capas granular y piramidal. El conocimiento de este tipo de alteraciones se constituye en un elemento más de juicio, no solo en el discernimiento del tipo de muerte dominante (apoptosis o necrosis), sino también en la evaluación de una potencial vulnerabilidad

diferencial entre los diferentes sectores del hipocampo en el mantenimiento del cultivo organotípico agudo.

A diferencia de la sección anterior (§5.4.1), aquí las medidas para la región de CA2 se designan sin empleo del sufijo “(3)”, pues fueron tomadas en una distancia menor a 250 μm por debajo del límite CA2-CA1, rango que se estima inferior a la extensión total de CA2 (Paxinos, 2004), y que por ende implica la selección solo de células de CA2.

Giro Dentado: tanto las muestras con trauma como los controles experimentaron una reducción en el tamaño nuclear conforme aumento el tiempo de cultivo. Para cada tiempo particular el cambio en el área nuclear fue significativo respecto del tiempo anterior ($p < 0.001$). Al cabo de las 6h de cultivo, los tejidos con trauma experimentaron un encogimiento nuclear del 41% respecto de las 0h ($p < 0.001$); para los controles este encogimiento fue del 45% ($p < 0.001$). Respecto a los controles, las muestras con trauma presentaron núcleos más pequeños a las 0h ($p < 0.001$, $\eta^2 = 0.087$) y 6h ($p < 0.001$, $\eta^2 = 0.033$). A las 2h los núcleos de trauma fueron más grandes ($p < 0.001$, $\eta^2 = 0.259$).

CA3: tanto las muestras trauma como los controles experimentaron un encogimiento nuclear en el cultivo, sin embargo, entre las 2h y las 4h no mostraron cambios en el tamaño nuclear, es decir, exhibieron una reducción nuclear “discontinua”, primero a las 2h ($p < 0.001$) y luego a las 6h ($p < 0.001$). Al cabo de las 6h de cultivo, los tejidos con trauma sufrieron un encogimiento nuclear del 31% respecto de las 0h ($p < 0.001$); para los controles este encogimiento fue del 44% ($p < 0.001$). Respecto a los controles, las muestras con trauma presentaron núcleos más pequeños a las 0h ($p < 0.001$, $\eta^2 = 0.292$); mientras que a las 2h y 4h los núcleos de trauma fueron más grandes ($p < 0.001$, $\eta^2 = 0.161$; $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.063$, respectivamente).

CA2: debido a limitaciones en la disponibilidad de tejido, las medidas de área nuclear tomadas para los controles en el sector de CA2 fueron menores que las de trauma y su número impedían realizar análisis estadísticos. Por lo tanto, se reportan aquí solo los resultados concernientes a las muestras con trauma. En CA2, y a diferencia de los demás sectores del hipocampo, después de 4h de cultivo los núcleos no manifestaron ningún cambio en su tamaño, tan solo hasta la 6h de cultivo se registró una reducción significativa, del 18% ($p < 0.01$, $\eta^2 = 0.227$), en el área nuclear de las muestras con trauma respecto del tiempo 0h.

CA1: las muestras trauma experimentaron una reducción en el tamaño nuclear conforme aumentó el tiempo de cultivo. Para cada tiempo particular el cambio en el área nuclear fue significativo respecto del tiempo anterior ($p < 0.001$). Al cabo de las 6h de cultivo, se evidenció un encogimiento nuclear del 32% respecto de las 0h ($p < 0.001$). Por su parte los controles experimentaron un encogimiento nuclear alcanzadas las 2h de cultivo ($p < 0.001$), sin cambios adicionales para las horas posteriores. Respecto a los controles, las muestras con trauma presentaron núcleos más pequeños a las 0h y 6h ($p < 0.001$, $\eta^2 = 0.084$; $p < 0.001$, $\eta^2 = 0.045$, respectivamente); mientras que a las 2h y 4h los núcleos de trauma fueron más grandes ($p < 0.001$, $\eta^2 = 0.064$; $p < 0.01$, $\eta^2 = 0.021$, respectivamente).

Área nuclear en CA2 y CA3

Entre las muestras con trauma, solo las correspondientes a CA2 y CA3 presentaron núcleos de igual tamaño a las 0h de cultivo ($p=0.54$). Si se considera que las células de la capa piramidal de CA2 son relativamente similares en tamaño a las de CA3 (Paxinos, 2004), podría resultar interesante mostrar la evolución comparativa para el tamaño nuclear de estas muestras (figura 6.18). Aunque inicialmente con iguales tamaños, una vez en el cultivo los núcleos de CA3 sufren una reducción en área significativa respecto de CA2 ($p<0.001$ para 2h, 4h y 6h; $\eta^2=0.068$, $\eta^2=0.065$, $\eta^2=0.107$, respectivamente).

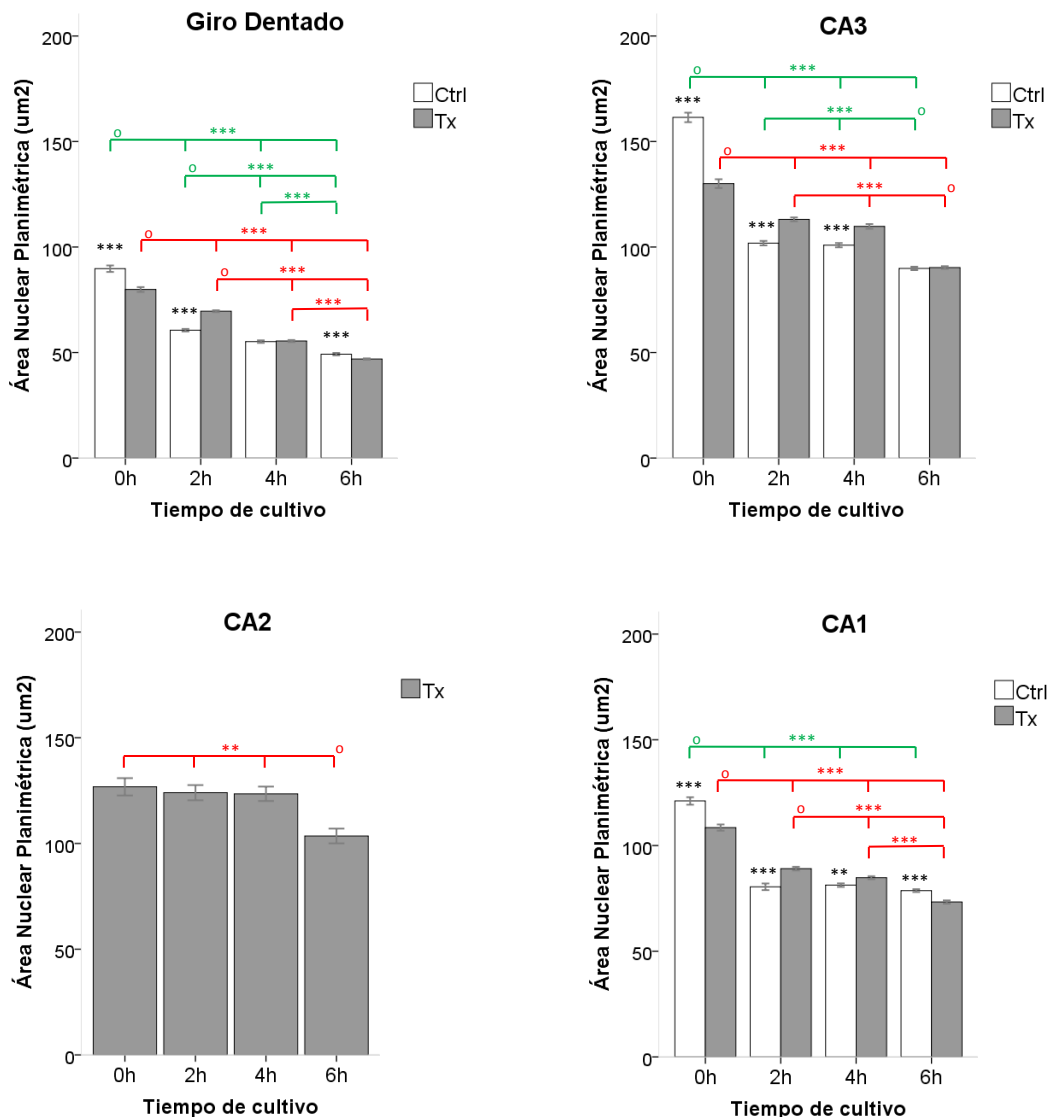


Figura 5.17. Tamaño nuclear, medido como área nuclear planimétrica, en la capa piramidal y granular del hipocampo.

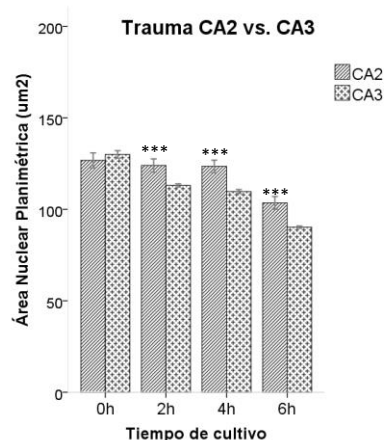


Figura 5.18. Comparación de la evolución del tamaño nuclear en las capas piramidales de CA2 y CA3 para las muestras con trauma.

5.4.3 Área nuclear para la IR “tipo puntos” de Caspasa-3 en tiempo 0h

Para la que hemos denominado IR tipo puntos en la expresión de la caspasa-3 (ver §5.3), no se cuantificó el tamaño nuclear de las células positivas en cultivo, debido a que la generalizada pérdida de esta marcación en las diferentes regiones del tejido impidió obtener los datos necesarios para tal fin. Por esta razón las comparaciones cuantitativas de tamaño nuclear únicamente se efectuaron en las muestras no cultivadas, es decir, el tiempo 0h. Este tipo de análisis morfológico, sujeto a un solo tiempo fijo, puede brindar pistas sobre la identidad de las células bajo estudio si se asume que el tamaño del núcleo guarda relación con el del citoplasma.

La obtención de datos para el análisis que aquí se presenta estuvo muy limitada por la inducción de *photobleaching*: dada la amplia distribución espacial de la IR tipo puntos, los tejidos debieron ser expuestos a múltiples sesiones de iluminación con el objetivo de 40x (ver Materiales y Métodos §4.5), que involucrando altas intensidades de la fuente causó el deterioro rápido de las muestras. En los controles el efecto fue más intenso debido a la baja fluorescencia de la IR tipo puntos. Por lo anterior, solo pudieron ser seleccionadas algunas pocas regiones para el análisis, no obstante ello no significó algún detrimento en las conclusiones emergentes.

Control: se calculó el área nuclear de la IR tipo puntos en el hipocampo, la corteza cerebral, la habénula y el cuerpo calloso (figura 5.19, A). Estadísticamente, la IR tipo puntos no mostró diferencia en el tamaño nuclear entre el hipocampo, la corteza cerebral y la habénula. Sin embargo, los núcleos en el cuerpo calloso resultaron estadísticamente más pequeños que los del hipocampo y la corteza lateral ($p < 0.001$), pero sin diferencias con los núcleos de la habénula y de la corteza ventral.

Trauma: se calculó el área nuclear de la IR tipo puntos en el hipocampo, la corteza cerebral, el septum, el estriado, el tubérculo olfatorio, el tálamo, la región ventral del hipotálamo y en el cuerpo calloso (figura 5.19, B). Por significancia estadística emergieron

dos grupos de regiones sin diferencias en tamaños nucleares al interior de cada uno, pero con diversas diferencias al ser comparadas entre ellos. El primero de estos grupos lo conforman el hipocampo, la corteza dorsal, la corteza lateral, el septum y el estriado. El segundo grupo, con núcleos más pequeños, lo conforman el cuerpo calloso, la región ventral del hipotálamo, el tálamo y la corteza ventral. Como caso particular se encontró el tubérculo olfatorio, región que estadísticamente no presenta diferencias con ninguno de los dos grupos. A continuación se detallan las diferencias estadísticas encontradas para las regiones con núcleos más pequeños: el cuerpo calloso en comparación con el hipocampo ($p<0.001$), la corteza dorsal ($p<0.01$), la corteza lateral ($p<0.001$), el septum ($p<0.001$) y el estriado ($p<0.05$); la región ventral del hipotálamo en comparación con el hipocampo ($p<0.001$), la corteza dorsal y lateral ($p<0.001$), el septum ($p<0.001$) y el estriado ($p<0.05$); el tálamo en comparación con CA3 ($p<0.001$) y CA1 ($p<0.05$); y la corteza ventral en comparación con CA3 y CA1 ($p<0.001$) y con el septum ($p<0.05$).

En el hipocampo, la corteza lateral, la corteza ventral y el cuerpo calloso, se efectuaron medidas tanto para trauma como para control. Al comparar ambos grupos experimentales solo el cuerpo calloso mostró diferencias significativas ($p<0.01$, $\eta^2=0.065$) (figura 5.20).

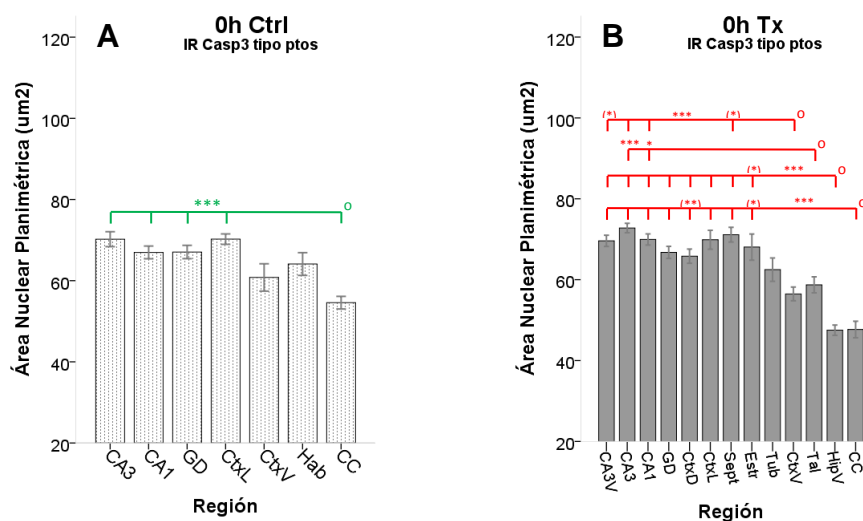


Figura 5.19. Tamaño nuclear, medido como área nuclear planimétrica, de las células con caspasa3-IR tipo puntos para las 0h de cultivo. Tanto en los controles como en trauma la IR tipo puntos se presenta en células cuyo tamaño nuclear se mantiene muy homogéneo entre diferentes regiones, por ejemplo en el hipocampo, la corteza dorsal, la corteza lateral, el septum, el estriado, entre otras.

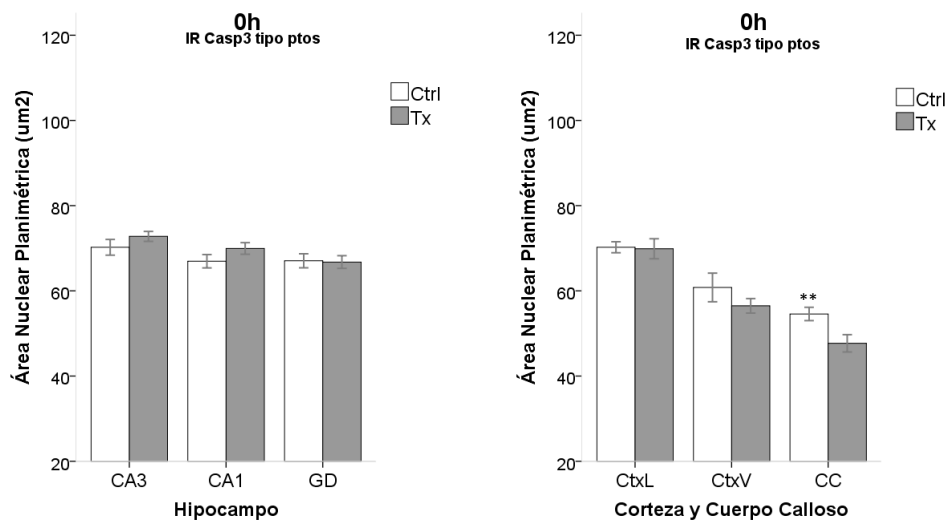


Figura 5.20. Tamaño nuclear, medido como área nuclear planimétrica, de las células con caspasa3-IR tipo puntos, comparando Trauma vs. Control para las 0h de cultivo.

5.4.4 Densidad de células caspasa-3-positivas con IR “tipo puntos”

El patrón de pérdida de la IR tipo puntos fue cuantificado mediante el cálculo de la densidad de células positivas para esta marcación en los diferentes tiempos de cultivo. Con tal propósito se seleccionaron diferentes regiones dentro del tejido nervioso procurando abarcar uniformemente el total de su área.

En la corteza cerebral a partir de las 4h la IR tipo puntos desapareció de las láminas corticales con excepción de la lámina I. Por esta razón todas las medidas de densidad en corteza se hicieron sobre los sectores más superficiales, ajustando la ventana de conteo a partir de la lámina I (ver Materiales y Métodos §4.5.3).

Corteza Dorsal: tanto en las muestras con trauma como en los controles, para las primeras 2h de cultivo no se presentaron cambios significativos en la densidad de las células IR tipo puntos, solo hasta las 4h registraron una reducción significativa del 47% y 34% ($p < 0.001$) respectivamente, que luego se mantuvo sin cambios hasta las 6h. Con respecto a los controles, el tejido con trauma solo presentó una reducción significativa en la densidad de la marcación para las 4h de cultivo ($p < 0.05$).

Corteza Lateral: en las muestras con trauma durante las 2h y 4h de cultivo se produjo una reducción gradual de la densidad de la marcación, alcanzando el 44% de su valor a las 0h ($p < 0.001$) para luego mantenerse sin cambios hasta las 6h. En los controles la reducción significativa solo se dio hasta las 4h de cultivo y al igual que con las muestras con trauma, luego se mantuvo sin cambios estadísticos hasta las 6h. Entre las muestras de los controles y con trauma no se presentaron diferencias significativas para ningún tiempo de cultivo.

Corteza Ventral: tanto en las muestras con trauma como en los controles, para las primeras 2h de cultivo no se presentaron cambios significativos en la densidad de la marcación, solo hasta las 4h se registró una reducción significativa promedio del 36% ($p<0.001$) que luego se mantuvo sin cambios hasta las 6h. Entre las muestras de los controles y con trauma no se presentaron diferencias significativas para ningún tiempo de cultivo.

Hipotálamo (región ventral): tanto las muestras con trauma como las de los controles sufrieron una reducción abrupta en la densidad de la marcación durante las primeras 2h de cultivo, del 65% ($p<0.001$) y 48% ($p<0.05$) respectivamente. Este nivel bajo de densidad se mantuvo luego sin cambios hasta las 6h. Entre las muestras de los controles y con trauma no se presentaron diferencias significativas para ningún tiempo de cultivo.

Hipotálamo (región medial): tanto las muestras con trauma como los controles experimentaron una reducción abrupta de la densidad de células IR tipo puntos a las 2h de cultivo, del 62% ($p<0.05$) y 70% ($p<0.05$) respectivamente. Para las 4h de cultivo la IR tipo puntos prácticamente desapareció de la región ($p<0.001$). A las 6h ningún grupo registró marcación ($p<0.001$). Entre las muestras de los controles y con trauma no se presentaron diferencias significativas para ningún tiempo de cultivo.

Septum: las muestras con trauma en las primeras 2h de cultivo mostraron una reducción promedio en la densidad de la IR tipo puntos que sin embargo no resultó significativa. Para las 4h el cambio fue absoluto, desapareciendo la marcación ($p<0.01$) y permaneciendo así hasta las 6h ($p<0.01$). Los controles experimentaron una reducción en la marcación a las 4h del 78% respecto del tiempo 0h. Ya para las 6h de cultivo la marcación fue prácticamente nula ($p<0.001$). Con respecto a los controles, el tejido con trauma presentó una reducción significativa en la densidad de la marcación para las 4h ($p<0.05$), tiempo para el cual ya no se registró este tipo de IR.

Estriado: tanto las muestras con trauma como los controles no mostraron diferencias en la densidad de la marcación durante las primeras 2h de cultivo. A las 4h en ambos grupos experimentales la marcación fue casi nula ($p<0.001$). Alcanzadas las 6h la marcación desapareció completamente ($p<0.001$). Entre las muestras de los controles y con trauma no se presentaron diferencias significativas para ningún tiempo de cultivo.

Tálamo: tanto las muestras con trauma como los controles no mostraron diferencias significativas en la densidad de la marcación durante las primeras 2h de cultivo, a pesar de que para este tiempo los promedios estuvieron un 33% por debajo de las 0h. Para las 4h la marcación desapareció en las muestras con trauma, y en los controles estuvo muy cercana a ser nula ($p<0.001$). A las 6h ningún grupo registró marcación ($p<0.001$). Entre las muestras de los controles y con trauma no se presentaron diferencias significativas para ningún tiempo de cultivo.

Cuerpo calloso: en las muestras con trauma, durante las primeras 2h de cultivo no se registraron cambios estadísticamente significativos en la densidad de la IR tipo puntos. A las 4h esta marcación se redujo un 87% ($p<0.001$) respecto del tiempo 0h; a las 6h el conteo de la marcación fue muy escaso manteniéndose en promedio por debajo del mostrado a las 4h pero sin ser significativa esta diferencia. La reducción total en la

densidad de la marcación al cabo de las 6h para trauma fue del 97.5%. Las muestras de los controles mostraron una reducción en la densidad de la marcación respecto de los tiempos precedentes a las 2h del 51.5% ($p<0.05$) y a las 4h del 47% ($p<0.05$). Para las 6h la densidad se mantuvo sin cambios significativos respecto de las 4h. La reducción total en la densidad de la marcación al cabo de las 6h para los controles fue del 85.5% ($p<0.001$). Con respecto al tejido de los controles, el tejido con trauma presentó una reducción significativa en la densidad de la marcación para las 0h de cultivo del 26% ($p<0.05$).

Giro Dentado: tanto las muestras con trauma como los controles presentaron una reducción significativa en la densidad de la marcación a las 2h, del 51% ($p<0.001$) y 44% ($p<0.05$) respectivamente. Para las 4h la IR desapareció en los trauma ($p<0.001$) y en los controles estuvo muy cercana de ser nula ($p<0.001$). A las 6h ningún grupo registró marcación en la región ($p<0.001$). Con respecto a los controles, el tejido con trauma presentó una reducción significativa en la densidad de la marcación para las 4h ($p<0.05$), tiempo para el cual ya no registró este tipo de IR.

CA3: en las muestras con trauma, las primeras 2h de cultivo mostraron una reducción promedio en la densidad de la marcación del 20%; sin embargo, no resultó estadísticamente significativa esta diferencia. A las 4h la marcación se perdió por completo y así continuo hasta las 6h ($p<0.001$). Los controles sufrieron un cambio similar pero la reducción se hizo significativa a las 2h, con un 42% ($p<0.05$) menos en la densidad. Entre las muestras de los controles y con trauma no se presentaron diferencias significativas para ningún tiempo de cultivo.

CA2: las muestras con trauma experimentaron una reducción en la densidad de la marcación del 45% ($p<0.01$) a las 2h de cultivo. A las 4h la reducción fue del 90.5% ($p<0.01$) respecto de las 2h y del 95% ($p<0.001$) respecto de las 0h, niveles casi nulos que se mantuvieron hasta las 6h ($p<0.001$). En las muestras de los controles, la disminución en la densidad a las 2h fue del 69% ($p<0.001$) y para las 4h del 94% ($p<0.001$), respecto del tiempo 0h. Para las 6h el conteo de la marcación fue prácticamente nulo ($p<0.001$). Con respecto a los controles, el tejido con trauma presentó una reducción significativa del 24% en la densidad de la marcación para las 0h ($p<0.05$).

CA1: las muestras con trauma exhibieron una reducción en la densidad de la IR tipo puntos del 97% ($p<0.001$) a las 4h de cultivo. A las 6 horas, la IR desapareció por completo. Los controles mostraron una reducción en la densidad del 46% ($p<0.05$) a las 2h de cultivo, y a las 4h del 97% ($p<0.001$), respecto del tiempo 0h; nivel casi nulo que se mantuvo hasta las 6h de cultivo. Entre las muestras de los controles y con trauma no se presentaron diferencias significativas para ningún tiempo de cultivo.

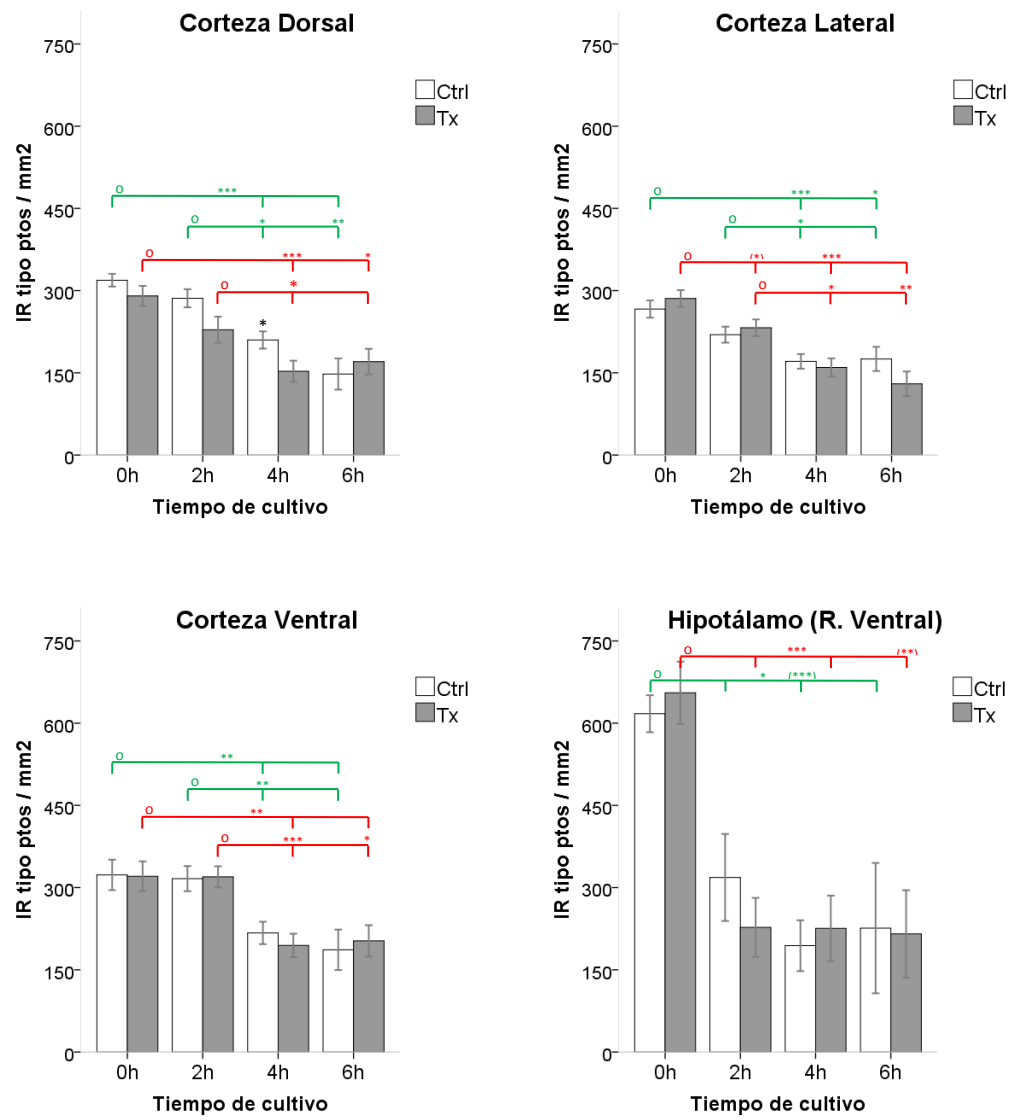
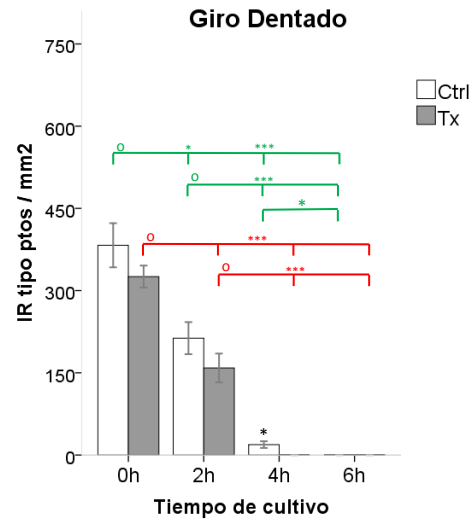
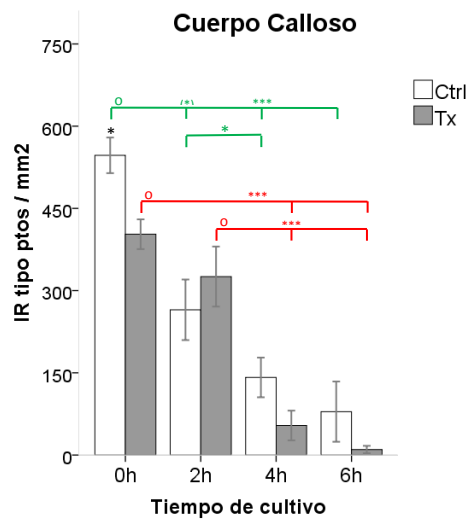
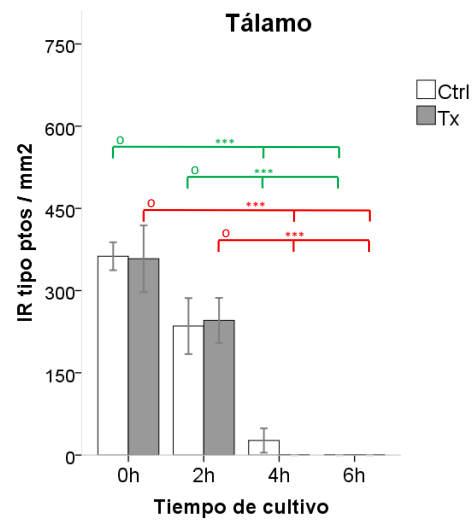
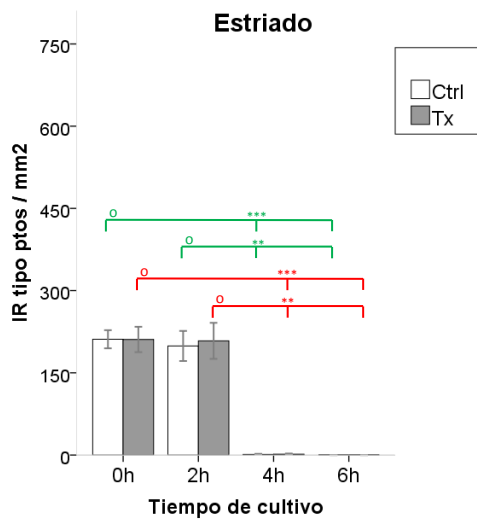
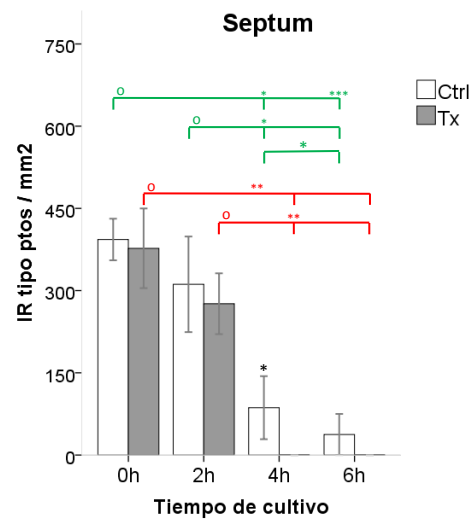
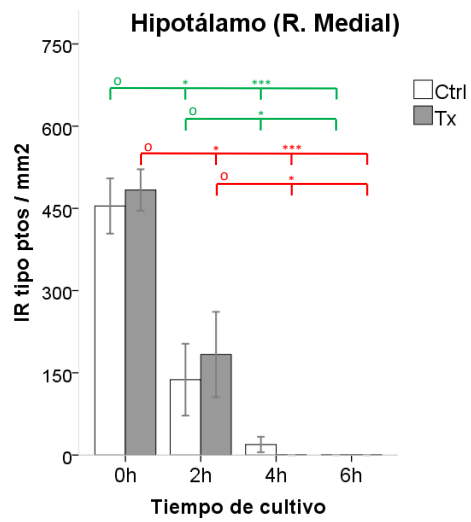


Figura 5.21. Densidad de las células caspase-3 positivas con IR tipo puntos



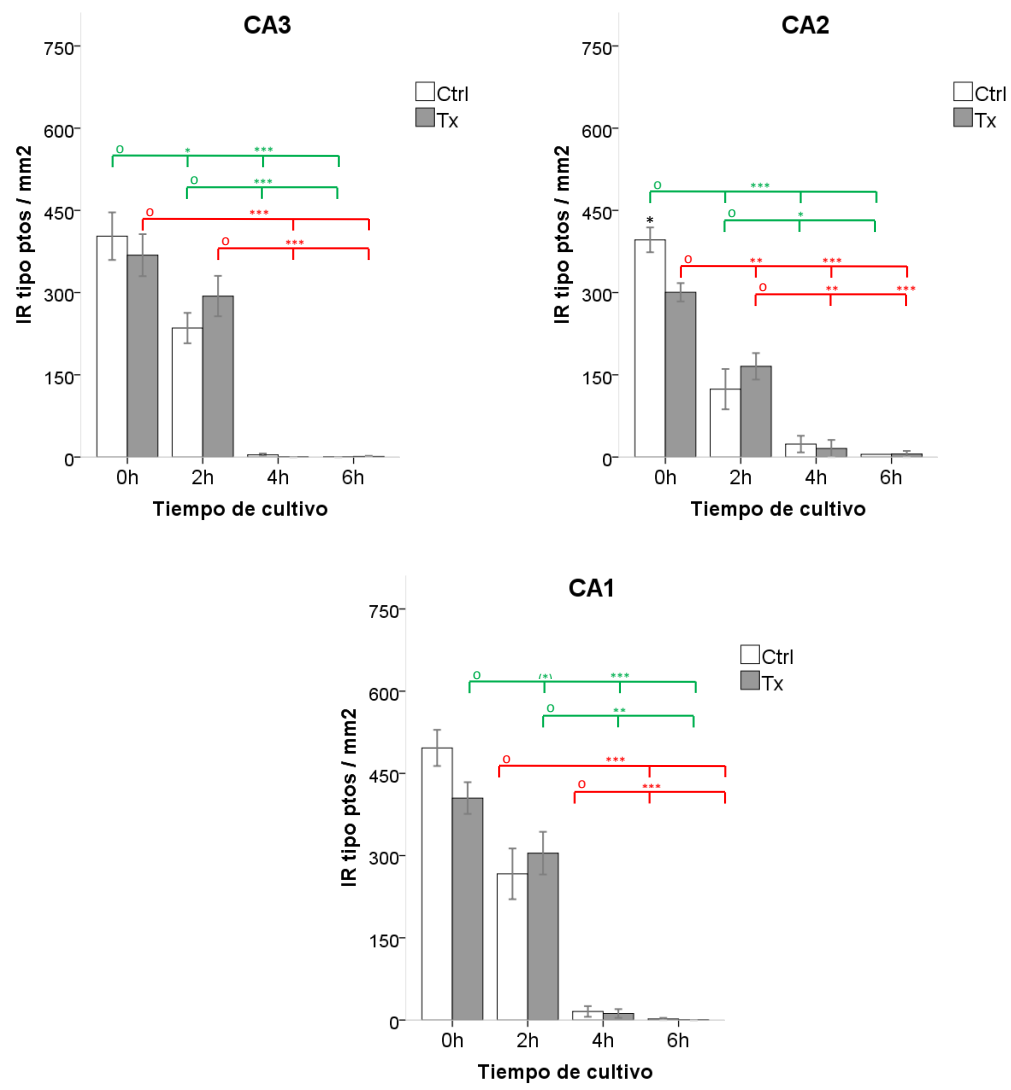


Figura 5.21. Densidad de las células caspase-3 positivas con IR tipo puntos

6. DISCUSIÓN

6.1 RESOLUCIÓN DE LA INMUNOFLUORESCENCIA PARA CASPASA 3

En este proyecto se abordó la evaluación de los cambios en los niveles de caspasa-3 clivada (activa) en un cultivo organotípico agudo de tajadas cerebrales empleando como principal herramienta la microscopía de fluorescencia de campo amplio. Las fuentes del tejido nervioso fueron biomodelos sometidos a trauma craneoencefálico (TCE) moderado, usando una modificación del modelo propuesto por Marmarou (Marmarou *et al.*, 1994; Abd-Elfattah Foda & Marmarou, 1994), con periodo de supervivencia post-trauma de 48 horas. Si bien, considerando modelos similares de lesión moderada (Park & Yi, 2001; Cernak *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2012), para este periodo de supervivencia podrían esperarse niveles bajos de caspasa-3 activa, en el cultivo sí cabría la posibilidad de encontrar niveles altos en diferentes regiones, además del hipocampo, pues la muerte programada podría dar inicio en estas regiones como consecuencia del procedimiento de corte de las tajadas (Rambani *et al.*, 2009), o adicionalmente, por el traumatismo mismo que implica el cultivo agudo, donde en esencia se induce un cambio abrupto sistémico en el tejido. Sin embargo, en términos generales para todos los tiempos de cultivo la marcación de caspasa-3, exceptuando la IR tipo puntos, en regiones diferentes al hipocampo fue difícil de detectar por inmunofluorescencia, hecho relacionado directamente con nuestras condiciones particulares para el procesamiento de los tejidos y para la captura digital, más no necesariamente con la ausencia de expresión de caspasa-3 clivada en estas regiones. Esto último pudo constataarse en nuestras muestras auxiliares destinadas al cálculo de la inmunorreactividad en el hipocampo, procesadas por inmunohistoquímica para caspasa-3, donde fue relativamente fácil identificar marcación diferente a la tipo puntos en la corteza cerebral para todos los tiempos del cultivo (datos no presentados). Sin embargo, con referencia específica al hipocampo, la evaluación cualitativa de los cambios en la marcación por inmunofluorescencia coincidió con aquella para la inmunohistoquímica. Estos hechos permiten concluir que nuestras valoraciones para la inmunorreactividad de caspasa-3 clivada por inmunofluorescencia están concebidas sobre la base de un “umbral” en la marcación, y por tanto estarían referidas a los cambios más pronunciados en la expresión de caspasa-3 activa. Cambios por debajo de este umbral no estarían cobijados en las evaluaciones, y se constituirían en el límite de resolución nuestro. Conocer con precisión este umbral requeriría de la evaluación comparativa de distintos métodos experimentales, lo cual está más allá de los propósitos de este proyecto. Sin embargo, debe quedar claro que en nuestra aproximación a la comprensión de los fenómenos biológicos, cada técnica experimental debe ser adoptada como un elemento más de juicio, precisamente por las resoluciones diferenciales implícitas en ellas. Para nuestro caso en particular, la resolución alcanzada permite evaluar las regiones del tejido nervioso con mayores cambios de expresión de los marcadores; y por lo tanto, las más susceptibles de ser valoradas cuantitativamente en el contexto de la

experimentación farmacológica con propósitos neuroprotectores, lo que va de la mano con los propósitos generales dentro del cual se enmarca este proyecto.

6.2 VULNERABILIDAD DIFERENCIAL EN EL HIPOCAMPO

6.2.1 Tejidos No cultivados

En los tejidos no cultivados, nuestros análisis cuantitativos mostraron que para un periodo post-trauma de 48 horas el sector del hipocampo con el mayor incremento en la inmunorreactividad para caspasa-3 clivada (Casp3-IR) fue la capa granular del giro dentado, con un aumento promedio de 238 unidades (ver Materiales y Métodos §4.5.2) respecto del control, seguido de la capa piramidal de CA1, con un aumento promedio de 100 unidades. En los sectores de CA2-3 y CA3 los cambios respecto de los controles no fueron estadísticamente significativos (figura 5.14). Considerando el aumento en la expresión de caspasa-3 activa como indicativo de la puesta en curso de procesos apoptóticos, estos datos estarían señalando que los sectores más vulnerables para nuestro modelo de lesión axonal difusa son CA1 y el giro dentado. La marcación para NeuN confirma estas observaciones, pues en los tejidos no cultivados solo en CA1 y en el giro dentado se presentó una reducción significativa en la inmunorreactividad para este marcador, hecho que indicaría degeneración o al menos pérdida neuronal (figura 5.16). Poder conocer con base en nuestros datos cuál de estas dos regiones es la más vulnerable al modelo de lesión no es una tarea fácil, pues los niveles de Casp3-IR en los controles de cada una de ellas son diferentes. La expresión de Casp3 en el control para el giro dentado supera en 150 unidades promedio a la correspondiente de CA1. Esto quiere decir que con independencia del TCE, las células de la capa granular del giro dentado podrían estar experimentando procesos degenerativos adicionales (o ser más propensos a ellos, lo que se discutirá más adelante en esta misma sección), que potenciarían los efectos del impacto, favoreciéndose el incremento en la activación de los programas de muerte celular en esta área contra los de CA1.

Las medidas de área nuclear planimétrica para los tejidos no cultivados mostraron que la condensación nuclear es una característica presente en todos los sectores del hipocampo de las muestras con trauma (en CA2 esto no pudo ser determinado debido a limitaciones en la disponibilidad de tejido), ver figura 5.17. Esto quiere decir que incluso en regiones más resistentes a nuestro modelo de lesión axonal difusa, como CA3, la condensación nuclear fue inminente aún sin presentar cambios en la Casp3-IR respecto de los controles. La condensación nuclear es una característica temprana de los procesos apoptóticos (Lo *et al.*, 1995; Daniel & DeCoster, 2004; Krysko *et al.*, 2008; DeCoster *et al.*, 2010; Joshi *et al.*, 2012; Berghe *et al.*, 2013); sin embargo, existen evidencias que señalan que la inducción de la apoptosis puede ocurrir como consecuencia de la condensación

citoplasmática (y la condensación nuclear asociada), y que esta condensación celular debe alcanzar un umbral tanto en volumen como en periodo de mantenimiento del encogimiento antes de que la apoptosis dé inicio, y por lo tanto, antes de que la caspasa-3 sea activada (Ernest *et al.*, 2008). Esto podría sugerir que en regiones como CA3, y presumiblemente CA2, la condensación nuclear para las 48h post-trauma (0h de cultivo) no alcanza los umbrales necesarios para la inducción de la apoptosis, y por lo tanto no exhiben una activación de Casp3 significativa, mostrándose como las regiones más resistentes, en lo que respecta a muerte celular programada a nuestro modelo de lesión. No obstante lo anterior, también podría pensarse que la condensación nuclear en CA3, y presumiblemente CA2, se refiere a etapas finales de muerte por necrosis (Lo *et al.*, 1995; Krysko *et al.*, 2008), sin embargo nosotros rechazamos esta hipótesis basados en la igualdad estadística para la NeuN-IR entre las muestras con trauma y los controles de estas regiones, lo que excluiría la degeneración por necrosis como consecuencia de la lesión.

El grado de vulnerabilidad en los diferentes sectores del hipocampo ha mostrado ser dependiente del tipo de modelo de lesión axonal difusa empleado. CA1 se ha reportado como una de las regiones más susceptible en modelos de lesión por aceleración sin impacto: en primates (Kotapca *et al.*, 1991); también en conejos, junto con el giro dentado (Runnerstam *et al.*, 2001); y en cerdos, junto con CA3 (Smith *et al.*, 1997). En modelos de lesión axonal difusa que involucran impacto, CA3 se ha señalado como una de las áreas más vulnerables (Cernak *et al.*, 2004), identificándose en ella la presencia de células apoptóticas (Chen *et al.*, 2013), y también, junto con el giro dentado, de fragmentación internucleosomal asociada tanto a apoptosis como a necrosis (Singleton *et al.*, 2002). Se debe tener presente que la lesión axonal difusa, y de manera general el TCE, no conlleva una respuesta patológica singular, sino más bien todo un abanico de fenotipos de lesión celular (Singleton & Povlishock, 2004) que pueden convivir en una misma estructura, como el hipocampo, lo que podría contribuir a la variabilidad regional, en términos de vulnerabilidad, entre los diferentes modelos experimentales de lesión. En nuestro caso, la mayor susceptibilidad del giro dentado y en especial de CA1, podría estar relacionada con el incremento que algunos estudios reportan de la excitabilidad en estos sectores después de un TCE (CA1: Reeves *et al.*, 2000; Griesemer & Mautes, 2007. GD: Toth *et al.*, 1997; Lowenstein *et al.*, 1992; Santhakumar *et al.*, 2001; Witgen *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2006), posiblemente ocasionado por el aumento en los compartimentos extracelulares de neurotransmisores excitatorios (Runnerstam *et al.*, 2001; Goda *et al.*, 2002; Fei *et al.*, 2005), o por cambios en la actividad inhibitoria (Dudek & Sutula, 2007; Alwis *et al.*, 2013). El incremento en la excitabilidad conllevaría a una elevación del calcio intracelular libre con la consecuente potencial activación de proteasas, como la calpaina o las caspasas, de fosfatasa, de proteína-quinasas o de óxido nítrico-sintetasas, todas las cuales han sido asociadas a mecanismos de muerte tanto apoptótica como necrótica (Kermer *et al.*, 1999; Raghupathi, 2004). No obstante lo anterior, hay estudios que dan cuenta de la supresión de la actividad en CA1 después de un TCE (Miyazaki *et al.*, 1992; Witgen *et al.*, 2005;

Schwarzbach *et al.*, 2006). Esta diversidad de respuestas fisiológicas puede entenderse como consecuencia de la variabilidad regional en la vulnerabilidad ante los diferentes métodos experimentales a la que se hacía alusión previamente.

La comparación de la expresión de Casp3 con los controles permite cuantificar el efecto experimental del trauma en los diferentes sectores del hipocampo y determinar aquellos de mayor vulnerabilidad a la lesión, como se acaba de mostrar. Por su parte, la comparación de la expresión de Casp3 entre las muestras de los controles para los tejidos no cultivados permite cuantificar probables procesos fisiológicos o patológicos con independencia de la lesión inducida. En los controles no cultivados, nosotros encontramos una alta Casp3-IR en el giro dentado (ver figura 5.13, Ctrl 0h) y el sector que denominamos CA2-3, que corresponde en su totalidad a CA2 incluyendo parte de la porción terminal de CA3. Los altos niveles de Casp3 en el giro dentado podrían estar relacionados con roles fisiológicos no apoptóticos. Al respecto se ha reportado la expresión de Casp3 en todas las capas del giro dentado en un estudio con ratas wistar durante desarrollo postnatal hasta P56 (Chang *et al.*, 2012). Los autores determinaron que conforme aumenta la edad de las ratas los niveles de la marcación en las diferentes capas disminuye con excepción de la capa granular, donde parecen conservar valores altos. Además, evaluando la co-localización de Casp3 con ki-67 y β -III-tubulina, proponen que la función de Casp3 está en parte relacionada con la proliferación y diferenciación celular, y que también puede estar relacionada con el crecimiento de neuritas, el transporte axónico y la elongación de dendritas de las células granulares durante el desarrollo postnatal. Sin embargo, en la literatura no se encuentran referencias de niveles tan altos como los nuestros de Casp3 en el giro dentado de ratas adultas de más de 2 meses de edad asociados a roles no apoptóticos en condiciones fisiológicas normales. Nuestras ratas tienen en promedio entre 5 y 6 meses de edad, y quizá la actividad reportada más cercana, aceptando la hipótesis no apoptótica, tenga relación con la neurogénesis en el giro dentado, proceso que se ha demostrado es significativamente elevado hasta los 6 meses de edad (Kuhn *et al.*, 1996). Pero la marcación de Casp3 que se describe asociada a este proceso casi que se restringe a la zona subgranular, mientras la nuestra está diseminada por toda la capa granular. Esto por supuesto no excluye la posibilidad de que nuestra marcación en el giro dentado, o incluso en CA2-3, este asociada a roles no apoptóticos, asunto que deberá ser dilucidado en el futuro. Otras causas de los niveles altos de Casp3 en el giro dentado de los controles no cultivados podrían estar asociadas a la deficiencia de vitamina E en la alimentación de los biomodelos (Ferri *et al.*, 2003) o su sometimiento a episodios de estrés (Heine *et al.*, 2004), y por supuesto también, junto con CA2-3, a condiciones patológicas. Estas últimas opciones en parte se desvirtúan ante la ausencia de manifestaciones clínicas evidentes y por el acogimiento a los estrictos protocolos de cría, alimentación y mantenimiento, seguidos por el personal profesional del bioterio de la Universidad del Valle.

El procedimiento experimental al que son sometidos los controles también podría contribuir, o ser la causa, de los niveles de Casp3-IR en el giro dentado y CA2-3 para

estas muestras. Quizá los elementos más críticos al respecto sean la anestesia y la perfusión del fijador. Nosotros empleamos isoflurano como anestésico inhalatorio por periodos de alrededor de 30 minutos. En la literatura se han reportado efectos neurotóxicos para este anestésico (Dallasen *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014) con activación de Casp3 en el hipocampo de ratas adultas (Lin & Zuo, 2011). Sin embargo, al parecer estos efectos requieren de prolongados tiempos de exposición, mínimo de hasta 2h, lo que los alejaría de nuestro caso. En la perfusión con el fijador, el proceso de exsanguinación por perfusión intracardiaca con solución fisiológica se constituye en el método de eutanasia para todos nuestros biomodelos no cultivados. Considerando la hipoxia/anoxia como el factor neurotóxico determinante para este caso, cabría esperar un compromiso importante de CA1, por cuanto se ha demostrado que este sector del hipocampo es el más susceptible a este tipo de lesión (Hota *et al.*, 2008; Maraula *et al.*, 2012). Sin embargo, los niveles de Casp3 en CA1 son los más bajos de nuestros controles, y adicionalmente, su NeuN-IR la más alta. Pareciera así que el procedimiento experimental está desligado de los niveles elevados de Casp3-IR independientes del TCE, pero el panorama es mucho más complejo de lo que puede parecer. Por ejemplo, la actividad osmótica del tejido nervioso puede ser destruida principalmente por el fijador antes de que este cumpla su propósito (Dempster, 1960), ocasionando un estrés hipo-osmótico que, para el caso del giro dentado, se ha demostrado que en cultivo celular primario conduce a la activación de Casp3 después de tan solo 1 minuto post-estrés (Niquet *et al.*, 2004). También se ha demostrado en cultivos hipocampales que el estrés hipo-osmótico puede potenciar la neurotoxicidad por hipoxia (Payne *et al.*, 1996). Esto puede ser pensado como la modificación en el umbral de respuesta ante el insulto hipóxico. Si tal modificación llegara a ser diferencial, hipotéticamente hablando, el estrés hipo-osmótico podría descender los umbrales de regiones resistentes como el giro dentado y CA2-3, incluso por debajo del de regiones susceptibles como CA1, activando procesos de muerte únicamente en las primeras. En cualquier caso, llegar a conocer las causas de la alta marcación de Casp3 en nuestros controles posiblemente requerirá de diferentes aproximaciones experimentales, y además, será de vital importancia para alcanzar una valoración no-sesgada de los efectos de nuestro modelo de lesión axonal difusa.

Podemos concluir entonces, que para mecanismos con independencia del TCE, las regiones presumiblemente más vulnerables en nuestro modelo de lesión axonal difusa son el giro dentado y CA2-3.

6.2.2 Tejidos en cultivo

Los datos de las muestras con trauma mostraron que en CA1 y CA3, a las 2h de cultivo se presentó un aumento en la expresión de Casp3 y luego a las 4h una reducción que se mantuvo hasta las 6h (ver figura 5.14). De estos dos sectores, el de mayor incremento en

la Casp3-IR como respuesta al cultivo fue CA1, con un aumento promedio de 111 unidades, seguido de CA3, con un aumento promedio de 61 unidades. La marcación para NeuN en estos sectores fue decreciente, con una caída abrupta para las 4h de cultivo que se mantuvo hasta las 6h (ver figura 5.16). Es notable que las muestras de los controles tanto para la Casp3-IR como para la NeuN-IR tienen una tendencia similar a la de las muestras con trauma en estas regiones; y además, que las dinámicas en la Casp3-IR son en esencia similares (ver figura 5.15: A, derecha; B, derecha). Estos datos indican que las células de la capa piramidal de los sectores CA1 y CA3, están en capacidad de iniciar procesos apoptóticos asociados al cultivo. En estos sectores, el incremento transitorio en la expresión de Casp3 parece estar limitado por la degeneración neuronal inducida en el mantenimiento del cultivo, que comprometería los niveles energéticos requeridos para sostener procesos apoptóticos (Elmore, 2007). Esto se evidencia después de las 4h, cuando la caída abrupta en la inmunorreactividad para NeuN coincide con el descenso de los niveles de Casp3. Contrario a lo que ocurre en CA1 y CA3, las células granulares en el giro dentado de las muestras con trauma parecen no estar en capacidad de iniciar procesos apoptóticos asociados al cultivo; esta fue la única región del hipocampo con un patrón decreciente en la Casp3-IR a lo largo de los periodos evaluados; y además, de manera interesante, la única región con una tendencia decreciente pero suave en la marcación para NeuN, es decir, sin exhibir ninguna caída abrupta. A pesar de no tener caída abrupta, debe resaltarse el hecho de que los niveles bajos en la NeuN-IR a las 4h de cultivo en el giro dentado, que son comparables a los de CA1, coinciden también con la caída más pronunciada en la Casp3-IR de este sector, sustentando la idea general de que la degeneración neuronal inducida en el mantenimiento del cultivo condiciona la expresión de Casp3.

El aumento en la expresión de Casp3 en los sectores CA1 y CA3 podría deberse más al proceso de corte de las tajadas que al mantenimiento del cultivo. Los cultivos organotípicos agudos se caracterizan por el rápido deterioro celular que impone un tiempo de vida típico de las tajadas de 6 a 12 horas, aunque ocasionalmente se han reportado tiempos máximos de vida de hasta 24 horas (Buskila *et al.*, 2014). La muerte de las tajadas parece involucrar la pérdida temprana de la integridad de la membrana plasmática (Buskila *et al.*, 2014), una característica que usualmente se asocia a tipos de muerte diferentes a la apoptosis (Lo *et al.*, 1995; Krysko *et al.*, 2008; Berghe *et al.*, 2013). Por lo tanto, sería lógico pensar que si existe activación de la Casp3 como consecuencia del mantenimiento del cultivo, esta estaría muy limitada, por cuanto los mecanismos de muerte se desviarían muy pronto de la apoptosis. Por otra parte, desde hace mucho se reconoce que el trauma mecánico generado por el corte de las tajadas tiene una gran repercusión en su viabilidad (Aitken *et al.*, 1995; Fukuda *et al.*, 1995), donde la muerte celular programada puede ser inducida como consecuencia de la difusión de químicos nocivos liberados por las células moribundas lesionadas durante este proceso (Rambani *et al.*, 2009). En el caso específico del hipocampo, se ha reportado que la axotomía primaria de las células piramidales durante el corte de las tajadas se constituye en uno de los

eventos más dañinos, y es también un factor clave para la inducción de la apoptosis (Legradi *et al.*, 2011), lo que parece coincidir con la elevación en los niveles de Casp3 en los sectores CA1 y CA3 registrada en nuestros cultivos.

El hecho de que en trauma las células granulares del giro dentado no presenten el incremento transitorio de Casp3 exhibido por las células piramidales de CA1 y CA3 podría deberse a la acción conjunta de dos situaciones. La primera, que de acuerdo con lo reportado por Legradi y colaboradores (Legradi *et al.*, 2011), la capa granular sea muy resistente al traumatismo ocasionado por el corte de las tajadas. Esta situación estaría apoyada por la caída suave en la inmunorreactividad para NeuN, que indica que el proceso degenerativo durante el cultivo para este sector, y sobre el cual influye el estado de las tajadas resultante del corte (Fukuda *et al.*, 1995), es el más lento. La segunda situación involucra los altos niveles de Casp3 en trauma que exhibe el giro dentado antes de que los procesos asociados al cultivo entren en consideración (ver sección anterior §6.2.1), situación que implicaría un gran número de programas de muerte celular y de mecanismos de degeneración en curso con la capacidad potencial de enmascarar el inicio de procesos apoptóticos relacionados con el cultivo. La inmunorreactividad para NeuN también apoya esta situación, pues la NeuN-IR en el giro dentado de las muestras con trauma no cultivadas es la más baja del hipocampo, lo que indicaría que esta es la región con mayor degeneración y para la que una vez en cultivo, los procesos apoptóticos desviarían más temprano a otros mecanismos de muerte, reduciéndose la expresión de Casp3 aun cuando la resistencia ante estos otros mecanismos de muerte sea mayor que las de las otras áreas. No debe tampoco descartarse la idea de que en cultivo algunos de los procesos apoptóticos ya iniciados en el giro dentado puedan culminar. La hipótesis de la acción conjunta entre la resistencia al corte de las tajadas y la de no incremento en la Casp3-IR como consecuencia del alto nivel de lesión previo al cultivo, podría ser sustentada con la respuesta de los tejidos de los controles para el giro dentado. Las muestras de los controles de este sector, y a diferencia de aquellos con trauma, experimentan una dinámica en la Casp3-IR similar a la de los sectores CA1 y CA3. Esto sugiere que el nivel más bajo en la Casp3-IR de los controles en el tiempo 0h les da la posibilidad de responder ante el trauma mecánico producto del corte de las tajadas, adicionalmente; el tamaño menor de esta respuesta (59 unidades) para las 2h de cultivo, comparado con la de los controles de CA1 (141 unidades) y CA3 (85 unidades), muestra a la vez que esta región es más resistente a este proceso.

En lo que respecta a la capa piramidal de CA2, nosotros encontramos que su respuesta al cultivo es la más singular de todas. Los análisis estadísticos indicaron la no diferencia significativa en la marcación de Casp3 a lo largo de todos los periodos evaluados en la región CA2-3 (figura 5.14). En esta región, a pesar de que se incluye la porción terminal de CA3, es el sector de CA2 el que más contribuye a la expresión de Casp3, lo que se deduce de la evidente diferencia en los niveles de Casp3 entre CA3 y CA2-3. Esto quiere decir que a lo largo del cultivo prácticamente los niveles de Casp3 en CA2 no cambian. De manera interesante, fue CA2 la única región del hipocampo que no experimentó

condensación nuclear sino hasta la sexta hora de cultivo (figura 5.17), lo que estaría indicando que la posible inducción de procesos apoptóticos (Ernest *et al.*, 2008) durante el curso del cultivo se presentaría de forma muy tardía en esta región. La manera más plausible para que los niveles de Casp3 expresados a las 0h se mantengan durante el curso del cultivo, es que las células de la capa piramidal de CA2 no experimenten además de la apoptosis, tampoco otros procesos de degeneración y que no se vean marcadamente afectados por el proceso de corte en tajadas. Lo anterior nos permite concluir que CA2 es el área del hipocampo más resistente a los procesos asociados al cultivo agudo, lo que va de la mano también con su mostrada resistencia a nuestro modelo de lesión axonal difusa. Sin embargo, como se expuso en la sección anterior, es una de las áreas presumiblemente susceptibles a mecanismos de muerte con independencia del TCE.

La inmunorreactividad para NeuN debería reflejar el hecho de que CA2 sea la región más resistente al cultivo, sin embargo, la evolución de esta marcación en CA2-3 (figura 5.16) se asemeja a la de regiones susceptibles como CA1 y CA3. Nosotros consideramos que esta aparente discrepancia se debe a que es la porción terminal de CA3 la que está contribuyendo más a la NeuN-IR de CA2-3, de manera inversa a lo que ocurre para la Casp3-IR, lo que se deduce de la cercana similitud en los niveles de NeuN entre CA3 y CA2-3. Es posible que la marcación para NeuN en CA2 tenga realmente una evolución similar a la mostrada en el giro dentado, sin embargo nuestro planteamiento técnico para el cálculo de la inmunorreactividad no permitió corroborar esto (ver §4.5.2 y §5.4.1).

La exhibida resistencia de CA2 en nuestro diseño experimental, al impacto, al corte de las tajadas cerebrales y al mantenimiento del cultivo agudo, concuerda con el calificativo de “sector resistente” que se le adjudica en la literatura de epilepsia humana (Corsellis & Bruton, 1983). Esta región posee una marcación mucho más densa para la proteína atrapadora de calcio Parvalbúmina que las regiones adyacentes de CA1 o CA3 (Baimbridge & Miller, 1982; Leranthe & Ribak, 1991; Sloviter *et al.*, 1991), también la proteína atrapadora de calcio Calbindina, comúnmente encontrada en interneuronas inhibitorias, está presente en las células piramidales de CA2 (Leranthe & Ribak, 1991; Toth & Freund, 1992). Lo anterior resulta interesante pues las proteínas atrapadoras de calcio se consideran un elemento importante en mecanismos tanto a nivel molecular como celular que media la protección contra la excitotoxicidad. También se ha demostrado que CA2 posee una gran estabilidad sináptica que impide que formas de plasticidad como la potenciación o la depresión a largo plazo se induzcan con los métodos convencionales de estimulación, lo que podría ser determinante en la resistencia a la enfermedad, el trauma y la hipoxia (Zhao *et al.*, 2007).

A pesar de que ni las muestras de los controles ni las muestras con trauma en CA2-3 experimentan cambios significativos en los niveles de Casp3 a lo largo del cultivo (marcación que ya se discutió es aportada principalmente por CA2), es interesante notar que las tendencias para estas marcaciones poseen un alto grado de correlación con la de

los controles en el giro dentado y con la de las muestras con trauma en CA3 (figura 5.15: A izquierda, B izquierda, respectivamente). Esto indica que realmente los procesos asociados al cultivo si inducen una respuesta en CA2, aunque muy sutil, y que ésta respuesta posee una dinámica generalizada, lo que posiblemente sea un reflejo de su conectividad con CA1, CA3 y el giro dentado.

6.3 VENTANA TEMPORAL PARA LA EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEBIDOS AL TRAUMA EN EL HIPOCAMPO (PERIODO DE VIABILIDAD HIPOCAMPAL EN CULTIVO)

Las medidas de área nuclear planimétrica muestran que tanto las muestras con trauma como las de los controles experimentan condensación nuclear a lo largo del curso del cultivo, sin embargo, la mayor reducción del tamaño nuclear la presentan los controles a las 2h (en control reducciones de: 32.5% en el GD, 37% en CA3, 33.5% en CA1; en trauma reducciones de: 13% en el GD, 13% en CA3, 18% en CA1; figura 6.17). Después de las 2h de cultivo, es decir, para las 4h y 6h, las comparaciones en las reducciones en los tamaños nucleares entre los grupos experimentales de trauma y control no tienen una significancia sustancial grande, como se deduce de los valores para el tamaño del efecto η^2 (Cohen, 1988): giro dentado, 6h: $\eta^2 = 0.033$; CA3, 4h: $\eta^2 = 0.063$; CA1, 4h: $\eta^2 = 0.021$, 6h: $\eta^2 = 0.045$. Estos datos sugieren por una parte, que los mecanismos de muerte asociados al cultivo evidentemente pueden desviar los procesos apoptóticos iniciales, como se planteó al inicio de la sección anterior, pero también podrían estar señalando estadios finales de muerte necrótica *durante el cultivo*, donde la condensación nuclear ocurriría (Lo *et al.*, 1995; Krysko *et al.*, 2008). Por otra parte, los datos de condensación nuclear indican que entre las 2h y las 4h de cultivo es posible establecer diferencias confiables entre la evolución de los tejidos controles y aquellos con trauma. Los datos para la Casp3-IR también parecen apoyar esta conclusión, pues en las regiones más susceptibles a nuestro modelo de lesión, es decir, el giro dentado y CA1, solo hasta las 2h de cultivo se conservan las diferencias significativas entre las muestras con trauma y las de los controles de manera conjunta (figura 5.14). Adicionalmente, la expresión de NeuN hasta las 2h de cultivo presenta una caída relativamente pequeña en comparación con las 0h: reducciones para las muestras con trauma de 20% en CA1, 21% en CA3 y 13% en giro dentado; reducciones para control de 30% en CA1, 15% en CA3 y 20.5% en giro dentado. Ya para las 4h de cultivo las caídas en la NeuN-IR son grandes respecto de las 0h: reducciones para las muestras con trauma de 76.5% en CA1, 84% en CA3 y 47% en giro dentado; reducciones para las muestras control de 81% en CA1, 85% en CA3 y 47% en giro dentado. Todo lo anterior nos permite concluir que a partir de las 4 horas de cultivo es muy difícil establecer diferencias cuantitativas para la Casp3-IR entre las muestras con trauma y control en el hipocampo, debido a que los avanzados procesos de degeneración asociados, cuantificados con la pérdida de NeuN-IR, afectan casi que por igual a las células de ambos grupos, enmascarando así los efectos debidos al TCE inducido.

Esta ventana de 2h coincide con lo reportado previamente en nuestro grupo de investigación para cultivos organotípico agudos de tajadas de neocorteza obtenidas de muestras extraídas en craniectomía decompresiva en humanos después de TCE (Riascos, 2007). En este estudio, después de evaluar la evolución de las tajadas en cultivo hasta por 14 horas valorando las marcaciones para NeuN y MAP2 en cortes histológicos, se pudo establecer que entre las 2h y las 6h de cultivo las muestras exhibieron una preservación parcial de la estructura cortical y de la integridad de las 6 láminas corticales, después de este periodo la degeneración neuronal fue apremiante. Por otro DAlo, en un estudio ejecutado en paralelo con muestras del presente proyecto (Guzmán, 2013), nuestro grupo de investigación, empleando análisis por citometría de flujo, pudo determinar que el porcentaje de supervivencia en células disociadas de corteza frontal de rata para las 4h de cultivo era del 71% en las muestras de los controles y del 49% en las muestras con trauma. Ésta marcada diferencia entre las muestras controles y con trauma estaría confirmando que los procesos de degeneración en el hipocampo son más acentuados que los de la corteza cerebral, y además, que a las 4h de cultivo se presenta un avanzado estado de deterioro en las muestras de sujetos sometidos al TCE.

6.4 NATURALEZA DE LA IR TIPO PUNTOS

El tipo de marcación para Casp3 activa que nosotros denominamos IR “tipo puntos”, se caracterizó por estar circunscrita a núcleos circulares pequeños, por no co-localizar con NeuN y por presentar una amplia distribución en los tejidos no cultivados tanto de las muestras control como de las con trauma. Durante el cultivo esta amplia distribución se vio alterada como consecuencia de la desaparición paulatina de la inmunorreactividad.

Las medidas de densidad para esta marcación mostraron que de las regiones evaluadas solo en el cuerpo calloso y en zonas aledañas a CA2 el trauma propicio un efecto estadísticamente significativo, de reducción, en las muestras no cultivadas (figura 5.21). De manera interesante, se ha reportado que la lesión axonal difusa inducida con el modelo de Marmarou produce un desprendimiento de la cubierta de mielina alrededor de los segmentos axonales lesionados (Büki & Povlishock, 2006), lo que podría implicar mecanismos de degeneración conducentes a la pérdida de oligodendrocitos. Estos mecanismos podrían ser apoptóticos considerando la condensación nuclear asociada con la IR tipo puntos que exhibió el cuerpo calloso como consecuencia del trauma (figura 5.20). El desprendimiento de la mielina compromete la adhesión de los procesos de los oligodendrocitos con el axón y probablemente con elementos de matriz extracelular. Considerando que la unión de las integrinas, moléculas de adhesión celular, con substratos de la matriz extracelular, que podrían también ubicarse dentro del tracto axónico, influyen en los oligodendrocitos la señalización de supervivencia basada tanto en receptores de factores de crecimiento (GFR, por sus siglas en inglés) como en receptores no-GFR (O'Meara *et al.*, 2010), creemos que es posible que la IR tipo puntos

sea una marcación referida principalmente a oligodendrocitos. Esta hipótesis concordaría con la reducción de la IR tipo puntos en el cuerpo calloso como consecuencia de la lesión, sin embargo, no sería muy evidente su relación con lo observado para CA2. Si bien las células de la capa piramidal de CA2 mostraron ser muy resistentes a nuestro modelo de lesión y al cultivo, en el caso de la IR tipo puntos son células ubicadas mayoritariamente en torno a la capa piramidal las que se ven afectadas. Curiosamente, en el *Cornu Ammonis* la mayor concentración de oligodendrocitos se halla en la parte interna de la capa *radiatum* de CA2 (Berger & Frotscher, 1994). Esta distribución tan particular podría aumentar las probabilidades de que los oligodendrocitos de CA2, a diferencia de los demás sectores, se vean afectados por los mecanismos de lesión. Se debe aclarar que nuestra aproximación para el cálculo de la densidad de la IR tipo puntos no permite establecer un mapeo fino de su distribución en el hipocampo, debido al tamaño relativamente grande de la ventana de conteo (ver §4.5.3 y figura 5.21), por ello explícitamente no podemos verificar la mayor densidad en la parte interna de la capa *radiatum* de CA2 pero sí sus probables implicaciones, como se acaba de señalar.

Los valores de tamaño nuclear asociados con la marcación tipo puntos también podrían apoyar nuestra hipótesis sobre su presencia en oligodendrocitos. A pesar de que encontramos diferencias estadísticas en el tamaño nuclear básicamente entre dos grupos de regiones, sobresale la homogeneidad de este parámetro entre sectores muy diferentes del tejido nervioso, como la corteza dorsal, la corteza lateral, el hipocampo, el septum, el estriado, por nombrar algunos (figura 5.19). Estudios citomorfológicos demuestran que tal homogeneidad no es una característica ni neuronal (Valverde, 2002; Brodal, 2004; Gaitan, 2014) ni astrocítica (Matyash & Kettenmann, 2010; Oberheim *et al.*, 2012). En cambio los oligodendrocitos presentan un bajo grado de variabilidad en lo que respecta al tamaño de su soma en las diferentes regiones del encéfalo (Verkhratsky and Butt 2007). Nosotros encontramos que el área nuclear asociada a la marcación tipo puntos se encuentra principalmente entre los 50 y 75 μm^2 , lo que correspondería a un diámetro nuclear aproximado de entre 8 y 10 μm . Este tamaño nuclear pareciera encajar con el rango de 10 a 12 μm de diámetro que se reconoce para los somas de los oligodendrocitos en el encéfalo de rata (Kettenmann & Ransom, 2013). Por otra parte, otros tipos celulares como la microglia podrían ser adjudicados a esta marcación, sin embargo las áreas de los somas de estas células son aún menores que las áreas de los núcleos que nosotros medimos (ver p.e. para el giro dentado: Viana *et al.*, 2013), además la microglia, en su estado inactivo, posee tanto núcleos circulares como elongados (Haberland, 2007; Rubin *et al.*, 2008) y nosotros no pudimos verificar ningún núcleo elongado en nuestra marcación, ni en las muestras control ni en las con trauma.

El que esta marcación corresponda principalmente a oligodendrocitos aún queda por ser demostrado, así como también cuál puede ser el rol de la Casp3 activa en estos casos, considerando en particular que la marcación está presente (aunque mucho menor) también en los controles. La confirmación de la hipótesis de que esta marcación de Casp3 tipo puntos corresponde a oligodendrocitos y no a otro tipo celular, podría darse utilizando

la doble marcación de la Casp3 con algún otro marcador específico ya sea para oligodendrocitos, astrocitos o para microglia.

6.5 PÉRDIDA DE LA IR TIPO PUNTOS (VIABILIDAD DEL CULTIVO AGUDO)

La Casp3-IR tipo puntos puede ayudar a visualizar como es la evolución espacial de la pérdida celular en las tajadas como consecuencia del mantenimiento del cultivo agudo. Nuestras observaciones de la densidad de la IR tipo puntos, tanto cualitativas como cuantitativas, mostraron que en términos generales entre las 2h y las 4h de cultivo marcan el límite de viabilidad de las tajadas, resultado que concuerda con el periodo de viabilidad determinado para las neuronas de las capas piramidal y granular en el hipocampo. La IR tipo puntos conforme avanzó el tiempo de cultivo se fue disminuyendo; después de 4h, sectores como la región medial del hipotálamo, el septum, el estriado (exceptuando la región limitante con los ventrículos laterales), el tálamo, el cuerpo calloso, el hipocampo, la corteza dorso medial y las láminas corticales diferentes a la I, perdieron prácticamente la marcación (ver figura 5.21 y sección §5.3). Al finalizar las 6 horas de cultivo tan solo en la lámina I de la corteza cerebral, en la región ventral del hipotálamo, en el núcleo medial de la habénula y en el tubérculo olfatorio se conservó esta marcación. Estos datos sugieren que la pérdida de la IR tipo puntos inicia en las regiones centrales del tejido y se va extendiendo hacia las porciones limitantes con la periferia o con cavidades internas grandes. Este patrón de pérdida coincide con lo que se esperaría de un transporte de masa limitado por difusión, en donde el oxígeno, el CO₂ y el LCR_a solo alcanzarían los sectores superficiales del tejido. En los cultivos organotípicos la destrucción del sistema circulatorio y el subsecuente suministro de oxígeno y nutrientes limitados por difusión ocasionan necrosis por isquemia en las regiones profundas de las tajadas (Rambani *et al.*, 2009), además en tajadas gruesas, como las nuestras, el transporte de masa inadecuado exacerba el decaimiento metabólico (Stoppini *et al.*, 1991) limitando la longevidad de los tejidos (Peterson & Albertson, 1998). Lo anterior nos permite argumentar que la pérdida de la IR tipo puntos corresponde efectivamente a la pérdida celular y no simplemente a cambios en la expresión de Casp3.

Es interesante notar que después de 4h de cultivo la IR tipo puntos en hipocampo prácticamente desaparece (ver figura 5.21, GD y CA1-3), mientras que la IR tipo neurona se conserva a pesar del cambio experimentado (ver figura 5.14 y sección §6.2.2). Esto sugiere que las células que experimentan la IR tipo puntos son particularmente más vulnerables a los efectos del agotamiento energético inducido en el mantenimiento del cultivo. Los oligodendrocitos tienen tasas metabólicas extremadamente elevadas las cuales se requieren para la mielinización apropiada de los axones. Como tal, ellos consumen grandes cantidades de oxígeno y ATP, lo que los hace muy susceptibles a las consecuencias moleculares del daño en el tejido (Kou & VandeVord, 2014), en ocasiones incluso por encima de las neuronas (Amaral *et al.*, 2013). Quizá esto sea una evidencia

más a favor de que esta población celular con IR tipo puntos corresponde a oligodendrocitos.

7. CONCLUSIONES

- En nuestro modelo experimental de lesión cerebral con lesión axonal difusa, el hipocampo presentó los cambios más significativos en la expresión de la caspasa-3 activa, permitiendo hacer una valoración cuantitativamente de los mismos.
- En los biomodelos, los sectores del hipocampo que presentaron mayores alteraciones en la expresión de la caspasa-3 activa después de generarles una lesión axonal difusa por caída libre de peso fueron CA1 y el giro dentado.
- En el hipocampo la región más resistente tanto a nuestro modelo de lesión axonal difusa como a la degeneración inducida en el cultivo agudo es CA2.
- Los análisis en la marcación de caspasa-3 activa y de NeuN permitieron establecer que entre las 2 y las 4 horas de cultivo organotípico agudo, es el periodo de mayor viabilidad de las tajadas. Adicionalmente, dentro de esta ventana temporal es posible seguir la evolución del trauma de forma diferencial respecto a los controles, al menos en lo que respecta a la expresión de Casp3 en el hipocampo.

8. PERSPECTIVAS DEL PRESENTE TRABAJO

Los cultivos organotípicos agudos representan una herramienta experimental valiosa en el estudio de fármacos neuroprotectores en trauma craneoencefálico (TCE). En estos cultivos, excluidos de barrera hematoencefálica, los patrones de conexiones sinápticas dentro de las tajadas están mínimamente alterados con respecto a los patrones *in vivo* al momento de la extracción, lo que abre la posibilidad a una evaluación futura directa de los efectos de fármacos sobre mecanismos fisiopatológicos que podrían reflejar aquellos desarrollados *in situ*.

En nuestro actual trabajo logramos determinar la línea de base del comportamiento de la expresión de la caspasa-3 activa en tajadas de cerebro de rata cultivadas después de lesión axonal difusa, así como también establecimos que la ventana temporal dentro de la cual sea posible estudiar el efecto de posibles fármacos neuroprotectores sea entre 2 y 4 horas de cultivo. Quizá esta ventana temporal sea posible extenderla un par de horas más, si el tiempo post-TCE sea inferior a las 48 horas, como fue el tiempo usado en el presente estudio.

También se logró determinar cuáles son las regiones del tejido cerebral más vulnerables al cultivo organotípico y a la lesión axonal difusa; y por tanto las más susceptibles de ser valoradas cuantitativamente en los estudios futuros con fármacos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Elfattah Foda, M. A., & Marmarou, A. (1994). A new model of diffuse brain injury in rats: Part II: Morphological characterization. *Journal of neurosurgery*, 80(2), 301-313.
- Alwis, D. S., Johnstone, V., Yan, E., & Rajan, R. (2013). Diffuse traumatic brain injury and the sensory brain. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 40(7), 473-483.
- Ahmed, S. H., He, Y. Y., Nassief, A., Xu, J., Xu, X. M., & Hsu, C. Y. (2000). Effects of lipopolysaccharide priming on acute ischemic brain injury. *Stroke*, 31(1), 193-199.
- Aitken, P. G., Breese, G. R., Dudek, F. F., Edwards, F., Espanol, M. T., Larkman, P. M., & Voulalas, P. J. (1995). Preparative methods for brain slices: a discussion. *Journal of neuroscience methods*, 59(1), 139-149.
- Amaral, A. I., Meisingset, T. W., Kotter, M. R., & Sonnewald, U. (2013). Metabolic aspects of neuron-oligodendrocyte-astrocyte interactions. *Frontiers in endocrinology*, 4.
- Arango-Dávila, C. A., Cardona-Gomez, G. P., Gallego-Gomez, J. C., Garcia-Segura, L. M., & Pimienta, H. J. (2004). Down-regulation of Bcl-2 in rat substantia nigra after focal cerebral ischemia. *Neuroreport*, 15(9), 1437-1441.
- Ashe, P. C., & Berry, M. D. (2003). Apoptotic signaling cascades. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(2), 199-214.
- Baimbridge, K. G., & Miller, J. J. (1982). Immunohistochemical localization of calcium-binding protein in the cerebellum, hippocampal formation and olfactory bulb of the rat. *Brain Res.* 245, 223–229.
- Becerra, L. V., & Pimienta, H. J. (2009). Apoptosis neuronal: la diversidad de señales y de tipos celulares. *Colombia Médica*, 40(1).
- Beer, R., Franz, G., Srinivasan, A., Hayes, R. L., Pike, B. R., Newcomb, J. K., Zhao, X., Schmutzhard, E., Poewe, W., & Kampfl, A. (2000). Temporal profile and cell subtype distribution of activated caspase-3 following experimental traumatic brain injury. *Journal of neurochemistry*, 75(3), 1264-1273.
- Berger, T., & Frotscher, M. (1994). Distribution and morphological characteristics of oligodendrocytes in the rat hippocampus in situ and in vitro: an immunocytochemical study with the monoclonal Rip antibody. *Journal of neurocytology*, 23(1), 61-74.

- Berghe, T. V., Grootjans, S., Goossens, V., Dondelinger, Y., Krysko, D. V., Takahashi, N., & Vandenabeele, P. (2013). Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods* 61 (2), 117–129.
- Born, M., & Wolf, E. (2003). *Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light* (7th ed., pp. 436-445). Cambridge University Press.
- Bramlett, H. M., & Dietrich, W. D. (2007). Progressive damage after brain and spinal cord injury: pathomechanisms and treatment strategies. *Progress in brain research*, 161, 125-141.
- Brodal, P. (2004). *The central nervous system: structure and function*. Oxford University Press.
- Browne, K. D., Chen, X. H., Meaney, D. F., & Smith, D. H. (2011). Mild traumatic brain injury and diffuse axonal injury in swine. *Journal of neurotrauma*, 28(9), 1747-1755.
- Büki, A., Okonkwo, D. O., Wang, K. K., & Povlishock, J. T. (2000). Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury. *The Journal of Neuroscience*, 20(8), 2825-2834.
- Büki, A., & Povlishock, J. T. (2006). All roads lead to disconnection?—Traumatic axonal injury revisited. *Acta neurochirurgica*, 148(2), 181-194.
- Buskila, Y., & Amitai, Y. (2010). Astrocytic iNOS-dependent enhancement of synaptic release in mouse neocortex. *J. Neurophysiol.* 103, 1322–1328.
- Buskila, Y., Abu-Ghanem, Y., Levi, Y., Moran, A., Grauer, E., & Amitai, Y. (2007). Enhanced astrocytic nitric oxide production and neuronal modifications in the neocortex of a NOS2 mutant mouse. *PloS one*, 2(9), e843.
- Buskila, Y., Breen, P. P., Tapson, J., van Schaik, A., Barton, M., & Morley, J. W. (2014). Extending the viability of acute brain slices. *Scientific reports*, 4.
- Cannon, J. R., & Greenamyre, J. T. (2009). NeuN is not a reliable marker of dopamine neurons in rat substantia nigra. *Neuroscience letters*, 464(1), 14-17.
- Carbonell, W. S., & Grady, M. S. (1999). Regional and temporal characterization of neuronal, glial, and axonal response after traumatic brain injury in the mouse. *Acta neuropathologica*, 98(4), 396-406.
- Cernak, I., Chapman, S. M., Hamlin, G. P., & Vink, R. (2002). Temporal characterisation of pro-and anti-apoptotic mechanisms following diffuse traumatic brain injury in rats. *Journal of clinical neuroscience*, 9(5), 565-572.

- Cernak, I., Vink, R., Zapple, D. N., Cruz, M. I., Ahmed, F., Chang, T., & Faden, A. I. (2004). The pathobiology of moderate diffuse traumatic brain injury as identified using a new experimental model of injury in rats. *Neurobiology of disease*, 17(1), 29-43.
- Chang, L., Zhang, X., Liu, W., Song, Y., Gao, X., Ling, W., & Wu, Y. (2012). Immunoreactivity of Ki-67/ β -tubulin and immunoco-localization with active caspase-3 in rat dentate gyrus during postnatal development. *Journal of chemical neuroanatomy*, 46(1), 10-18.
- Chen, J., Li, X., Qiu, J., You, H., Zhang, Q., Dong, G., & Zuo, Y. (2013). Kinetics of Apoptosis and Expression of Apoptosis-Related Proteins in Rat CA3 Hippocampus Cells After Experimental Diffuse Brain Injury. *Cell biochemistry and biophysics*, 67(3), 1015-1019.
- Chen, T., Zhang, L., Qu, Y., Huo, K., Jiang, X., & Fei, Z. (2012). The selective mGluR5 agonist CHPG protects against traumatic brain injury in vitro and in vivo via ERK and Akt pathway. *International journal of molecular medicine*, 29(4), 630-636.
- Clark, R. S., Kochanek, P. M., Chen, M., Watkins, S. C., Marion, D. W., Chen, J., Hamilton, R. L., Loeffert, J. E., & Graham, S. H. (1999). Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. *The FASEB journal*, 13(8), 813-821.
- Clark, R. S., Kochanek, P. M., Watkins, S. C., Chen, M., Dixon, C. E., Seidberg, N. A., Melick, J., Loeffert, J.E., Nathaniel, P.D., Jin, K.L., & Graham, S.H. (2000). Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurochemistry*, 74(2), 740-753.
- Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Routledge Academic.
- Colbert, C. M (2006). Preparation of cortical brain slices for electrophysiological recording. *Methods Mol. Biol.* 337, 117–25.
- Corsellis, J. A., & Bruton, C. J. (1983). Neuropathology of status epilepticus in humans. *Advances in neurology*, 34, 129.
- Crawford, E. D., & Wells, J. A. (2011). Caspase substrates and cellular remodeling. *Annual review of biochemistry*, 80, 1055-1087.
- Dallasen, R. M., Bowman, J. D., Xu, Y., Hashimoto, M., Katakura, M., Nabika, T., & Shido, O. (2011). Isoflurane does not cause neuroapoptosis but reduces astroglial processes in young adult mice. *Med Gas Res*, 1(1), 27.

D'Amelio, M., Cavallucci, V., & Cecconi, F. (2010). Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death & Differentiation*, 17(7), 1104-1114.

D'Amelio, M., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., & Cecconi, F. (2011). Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature neuroscience*, 14(1), 69-76.

D'Amelio, M., Sheng, M., & Cecconi, F. (2012). Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. *Trends in neurosciences*, 35(11), 700-709.

Daniel B., & DeCoster M. A. (2004). Quantification of sPLA2-induced early and late apoptosis changes in neuronal cell cultures using combined TUNEL and DAPI staining. *Brain Res Brain Res Protoc*, 13(3), 144-150.

Davoli, M. A., Fourtounis, J., Tam, J., Xanthoudakis, S., Nicholson, D., Robertson, G. S., NG, G. Y. K., & Xu, D. (2002). Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat. *Neuroscience*, 115(1), 125-136.

Dawodu, S., & Thom, M. (2005). Quantitative neuropathology of the entorhinal cortex region in patients with hippocampal sclerosis and temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 46(1), 23-30.

DeCoster, M. A., Maddi, S., Dutta, V., & McNamara, J. (2010). Microscopy and image analysis of individual and group cell shape changes during apoptosis. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, 836-843.

Dempster, W. T. (1960). Rates of penetration of fixing fluids. *American Journal of Anatomy*, 107(1), 59-72.

Dingledine, R., Dodd, J. & Kelly, J. (1980). The in vitro brain slice as a useful neurophysiological preparation for intracellular recording. *J. Neurosci. Methods* 2, 323-362.

Dudek, F. E., & Sutula, T. P. (2007). Epileptogenesis in the dentate gyrus: a critical perspective. *Progress in brain research*, 163, 755-773.

Dunn, K. W., Kamocka, M. M., & McDonald, J. H. (2011). A practical guide to evaluating co-localization in biological microscopy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 300(4), C723-C742.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.

- Ernest, N. J., Habela, C. W., & Sontheimer, H. (2008). Cytoplasmic condensation is both necessary and sufficient to induce apoptotic cell death. *Journal of cell science*, 121(3), 290-297.
- Escobar, M. I., Guzmán, F., Riascos, D., Villamil, L., & Pimienta, H. (2008). Alteración de la organización laminar y de la dendroarquitectura de la corteza cerebral del humano post-trauma craneoencefálico. *Colombia Médica*, 39.
- Farkas, O., & Povlishock, J. T. (2007). Cellular and subcellular change evoked by diffuse traumatic brain injury: a complex web of change extending far beyond focal damage. *Progress in brain research*, 161, 43-59.
- Farkas, O., Polgar, B., Szekeres-Bartho, J., Doczi, T., Povlishock, J. T., & Büki, A. (2005). Spectrin breakdown products in the cerebrospinal fluid in severe head injury—preliminary observations. *Acta neurochirurgica*, 147(8), 855-861.
- Fei, Z., Zhang, X., Jiang, X. F., Huang, W. D., & Bai, H. M. (2005). Altered expression patterns of metabotropic glutamate receptors in diffuse brain injury. *Neuroscience letters*, 380(3), 280-283.
- Ferri, P., Cecchini, T., Ciaroni, S., Ambrogini, P., Cuppini, R., Santi, S., & Papa, S. (2003). Vitamin E affects cell death in adult rat dentate gyrus. *Journal of neurocytology*, 32(9), 1155-1164.
- Fukuda, A., Czurkó, A., Hida, H., Muramatsu, K., Lénárd, L., & Nishino, H. (1995). Appearance of deteriorated neurons on regionally different time tables in rat brain thin slices maintained in physiological condition. *Neuroscience letters*, 184(1), 13-16.
- Gaetz, M. (2004). The neurophysiology of brain injury. *Clinical Neurophysiology*, 115(1), 4-18.
- Gaitan, O. L. (2014). Estudio citomorfológico de las interneuronas del área 10 de la corteza prefrontal humana (tesis de maestría). Universidad del valle, Cali, Colombia.
- Galehdar, Z., Swan, P., Fuerth, B., Callaghan, S. M., Park, D. S., & Cregan, S. P. (2010). Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4–CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *The Journal of Neuroscience*, 30(50), 16938-16948.
- Gennarelli, T. A. (1992). Mechanisms of brain injury. *The Journal of emergency medicine*, 11, 5-11.
- Gennarelli, T. A., Thibault, L. E., & Ommaya, A. K. (1972). *Pathophysiologic responses to rotational and translational accelerations of the head* (No. 720970). SAE Technical Paper.

- Gennarelli, T. A., Thibault, L. E., Adams, J. H., Graham, D. I., Thompson, C. J., & Marcincin, R. P. (1982). Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. *Annals of neurology*, 12(6), 564-574.
- Gibb, A. & Edwards, F. (1994). Patch clamp recording from cells in sliced tissues. *Microelectrode Tech.* 255–274.
- Gibson, S. F., & Lanni, F. (1989). Diffraction by a circular aperture as a model for three-dimensional optical microscopy. *JOSA A*, 6(9), 1357-1367.
- Gittins, R., & Harrison, P. J. (2004). Neuronal density, size and shape in the human anterior cingulate cortex: a comparison of Nissl and NeuN staining. *Brain research bulletin*, 63(2), 155-160.
- Griesemer, D., & Mautes, A. M. (2007). Closed head injury causes hyperexcitability in rat hippocampal CA1 but not in CA3 pyramidal cells. *Journal of neurotrauma*, 24(12), 1823-1832.
- Grøndahl, T. O. & Langmoen, I. A. (1993). Epileptogenic effect of antibiotic drugs. *J. Neurosurg.* 78, 938–43.
- Green, D. R., & Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305, 626–629.
- Goda, M., Isono, M., Fujiki, M., & Kobayashi, H. (2002). Both MK801 and NBQX reduce the neuronal damage after impact-acceleration brain injury. *Journal of neurotrauma*, 19(11), 1445-1456.
- Gould, E., Woolley, C. S., & McEwen, B. S. (1991). Naturally occurring cell death in the developing dentate gyrus of the rat. *Journal of comparative neurology*, 304(3), 408-418.
- Guzman, C. (2013). Viabilidad del modelo organotípico agudo de corteza cerebral de rata con trauma craneoencefálico por función mitocondrial (tesis de pregrado). Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Haberland, C. (2007). *Clinical neuropathology: text and color atlas*. Demos Medical Publishing.
- Hansen, P. C., Nagy, J. G., & O'leary, D. P. (2006). *Deblurring images: matrices, spectra, and filtering* (Vol. 3). Siam.
- Heine, V. M., Maslam, S., Zareno, J., Joels, M., & Lucassen, P. J. (2004). Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. *European Journal of Neuroscience*, 19(1), 131-144.

- Hoffman, G. E., Le, W. W., Murphy, A. Z., & Koski, C. L. (2001). Divergent effects of ovarian steroids on neuronal survival during experimental allergic encephalitis in Lewis rats. *Experimental neurology*, 171(2), 272-284.
- Holbourn, A. H. S. (1943). Mechanics of head injuries. *The Lancet*, 242(6267), 438-441.
- Hota, S. K., Barhwal, K., Singh, S. B., & Ilavazhagan, G. (2008). Chronic hypobaric hypoxia induced apoptosis in CA1 region of hippocampus: A possible role of NMDAR mediated p75^{NTR} upregulation. *Experimental neurology*, 212(1), 5-13.
- Hubbard, K. S., Gut, I. M., Scheeler, S. M., Lyman, M. E., & McNutt, P. M. (2012). Compatibility of SYTO 13 and Hoechst 33342 for longitudinal imaging of neuron viability and cell death. *BMC research notes*, 5(1), 437.
- Hwang, I. K., Yoo, K. Y., Nam, Y. S., Choi, J. H., Seo, K., Lee, I. S., & Won, M. H. (2006). Age-related changes in calretinin-immunoreactive periglomerular cells in the rat main olfactory bulb. *Journal of Veterinary Medical Science*, 68(5), 465-469.
- Jane, J. A., Steward, O., & Gennarelli, T. (1985). Axonal degeneration induced by experimental noninvasive minor head injury. *Journal of neurosurgery*, 62(1), 96-100.
- Jo, J., Whitcomb, D. J., Olsen, K. M., Kerrigan, T. L., Lo, S. C., Bru-Mercier, G., & Cho, K. (2011). A β (1-42) inhibition of LTP is mediated by a signaling pathway involving caspase-3, Akt1 and GSK-3 β . *Nature neuroscience*, 14(5), 545-547.
- Joshi, C., Karumuri, B., Newman, J. J., & DeCoster, M. A. (2012). Cell morphological changes combined with biochemical assays for assessment of apoptosis and apoptosis reversal. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology, Formatex Research Center, Badajoz*, 756-762.
- Katz, C., Zaltsman-Amir, Y., Mostizky, Y., Kollet, N., Gross, A., & Friedler, A. (2012). Molecular Basis of the Interaction between Proapoptotic Truncated BID (tBID) Protein and Mitochondrial Carrier Homologue 2 (MTCH2) Protein KEY PLAYERS IN MITOCHONDRIAL DEATH PATHWAY. *Journal of Biological Chemistry*, 287(18), 15016-15023.
- Keane, R. W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Alonso, O. F., Aldana, P., & Dietrich, W. D. (2001). Apoptotic and antiapoptotic mechanisms after traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 21(10), 1189-1198.
- Kettenmann, H., & Ransom, B. R., (2013). Neuroglia. Oxford : Oxford University Press.
- Kermer, P., Klöcker, N., & Bähr, M. (1999). Neuronal death after brain injury. *Cell and tissue research*, 298(3), 383-395.
- Khurana, S. & Li, W.-K. (2013). Baptisms of fire or death knells for acute-slice physiology in the age of “omics” and light. *Rev. Neurosci.* 24, 527–536.

- Kim, K. K., Adelstein, R. S., & Kawamoto, S. (2009). Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *Journal of biological chemistry*, 284(45), 31052-31061.
- King, A. I., Yang, K. H., Zhang, L., Hardy, W., & Viano, D. C. (2003, September). Is head injury caused by linear or angular acceleration. In *IRCOBI conference* (pp. 1-12).
- Kirshner, H., Aguet, F., Sage, D., & Unser, M. (2013). 3-D PSF fitting for fluorescence microscopy: implementation and localization application. *Journal of microscopy*, 249(1), 13-25.
- Knobloch, S. M., Alroy, D. A., Nikolaeva, M., Cernak, I., Stoica, B. A., & Faden, A. I. (2004). Caspase inhibitor z-DEVD-fmk attenuates calpain and necrotic cell death in vitro and after traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 24(10), 1119-1132.
- Kotapka, M. J., Gennarelli, T. A., Graham, D. I., Adams, J. H., Thibault, L. E., Ross, D. T., & Ford, I. (1991). Selective vulnerability of hippocampal neurons in acceleration-induced experimental head injury. *Journal of neurotrauma*, 8(4), 247-258.
- Kou, Z., & VandeVord, P. J. (2014). Traumatic white matter injury and glial activation: From basic science to clinics. *Glia*.
- Krimer, L. S., & Goldman-Rakic, P. S. (1997). An interface holding chamber for anatomical and physiological studies of living brain slices. *Journal of neuroscience methods*, 75(1), 55-58.
- Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K., & Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), 205-221.
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., & Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of neuroscience*, 16(6), 2027-2033.
- Kumar, S. S., & Buckmaster, P. S. (2007). Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in gerbil substantia nigra *pars reticulata*. *Brain research*, 1142, 54-60.
- Latt, S. A., & Stetten, G. (1976). Spectral studies on 33258 Hoechst and related bisbenzimidazole dyes useful for fluorescent detection of deoxyribonucleic acid synthesis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 24(1), 24-33.
- Latt, S. A., Stetten, G. A. I. L., Juergens, L. A., Willard, H. F., & Scher, C. D. (1975). Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 23(7), 493-505.

- Lavezzi, A. M., Corna, M. F., & Matturri, L. (2013). Neuronal nuclear antigen (NeuN): A useful marker of neuronal immaturity in sudden unexplained perinatal death. *Journal of the neurological sciences*, 329(1), 45-50.
- Lazic, S. E. (2009). Statistical evaluation of methods for quantifying gene expression by autoradiography in histological sections. *BMC neuroscience*, 10(5).
- Legradi, A., Varszegi, S., Szigeti, C., & Gulya, K. (2011). Adult rat hippocampal slices as in vitro models for neurodegeneration: Studies on cell viability and apoptotic processes. *Brain research bulletin*, 84(1), 39-44.
- Leranth, C., & Ribak, C. E. (1991). Calcium-binding proteins are concentrated in the CA2 field of the monkey hippocampus: A possible key to this region's resistance to epileptic damage. *Exp. Brain Res.* 85, 129–136.
- Lin, D., & Zuo, Z. (2011). Isoflurane induces hippocampal cell injury and cognitive impairments in adult rats. *Neuropharmacology*, 61(8), 1354-1359.
- Lin, M., Lucas Jr, H. C., & Shmueli, G. (2013). Research Commentary-Too Big to Fail: Large Samples and the p-Value Problem. *Information Systems Research*, 24(4), 906-917.
- Lind, D., Franken, S., Kappler, J., Jankowski, J., & Schilling, K. (2005). Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *Journal of neuroscience research*, 79(3), 295-302.
- Lipton, M. L., Gellella, E., Lo, C., Gold, T., Ardekani, B. A., Shifteh, K., & Branch, C. A. (2008). Multifocal white matter ultrastructural abnormalities in mild traumatic brain injury with cognitive disability: a voxel-wise analysis of diffusion tensor imaging. *Journal of neurotrauma*, 25(11), 1335-1342.
- Lo, A. C., Houenou, L. J., & Oppenheim R. W. (1995). Apoptosis in the nervous system: morphological features, methods, pathology, and prevention. *Arch Histol Cytol*, 58(2), 139-49.
- Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 2405–2419.
- Loeffert, J. E., Nathaniel, P. D., Jin, K. L., & Graham, S. H. (2000). Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats. *Journal of neurochemistry*, 74(2), 740-753.
- Lowenstein, D. H., Thomas, M. J., Smith, D. H., & McIntosh, T. K. (1992). Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *The Journal of neuroscience*, 12(12), 4846-4853.

Luhmann, H. J. & Kilb, W. (2012). Isolated Central Nervous System Circuits. *Neuromethods* 73, 301–314.

Lyck, L., Dalmau, I., Chemnitz, J., Finsen, B., & Schröder, H. D. (2008). Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(3), 201-221.

Manley, G. T., Rosenthal, G., Lam, M., Morabito, D., Yan, D., Derugin, N., Bollen, A., Knudson, M., & Panter, S. S. (2006). Controlled cortical impact in swine: pathophysiology and biomechanics. *Journal of neurotrauma*, 23(2), 128-139.

Mansoor, A. (2012). Statistical analysis and modeling of biological fluorescence images. Methods and applications (Doctoral dissertation). Purdue University, Indiana, United States.

Maraula, G., Traini, C., Mello, T., Coppi, E., Galli, A., Pedata, F., & Pugliese, A. M. (2012). Effects of oxygen and glucose deprivation on synaptic transmission in rat dentate gyrus: Role of A2A adenosine receptors. *Neuropharmacology*, 30(1), e10.

Marmarou, A., Foda, M. A. A. E., Brink, W. V. D., Campbell, J., Kita, H., & Demetriadou, K. (1994). A new model of diffuse brain injury in rats: Part I: Pathophysiology and biomechanics. *Journal of neurosurgery*, 80(2), 291-300.

Matyash, V., & Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain research reviews*, 63(1), 2-10.

McDonald, J. H., & Dunn, K. W. (2013). Statistical tests for measures of co-localization in biological microscopy. *Journal of microscopy*, 252(3), 295-302.

Mittl, R. L., Grossman, R. I., Hiehle, J. F., Hurst, R. W., Kauder, D. R., Gennarelli, T. A., & Alburger, G. W. (1994). Prevalence of MR evidence of diffuse axonal injury in patients with mild head injury and normal head CT findings. *American Journal of Neuroradiology*, 15(8), 1583-1589.

Miyazaki, S., Katayama, Y., Lyeth, B. G., Jenkins, L. W., DeWitt, D. S., Goldberg, S. J., & Hayes, R. L. (1992). Enduring suppression of hippocampal long-term potentiation following traumatic brain injury in rat. *Brain research*, 585(1), 335-339.

Molecular Probes (2005). Hoechst stains. Retrieved from <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp21486.pdf>

Mullen, R. J., Buck, C. R., & Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116(1), 201-211.

- Namura, S., Zhu, J., Fink, K., Endres, M., Srinivasan, A., Tomaselli, K. J., & Moskowitz, M. A. (1998). Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *The Journal of neuroscience*, 18(10), 3659-3668.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., Munday, N.A., Raju, S.M., Smulson, M.E., Yamin, T-T., Yu, V.L., & Miller, D.K. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376, 37-43.
- Niogi, S. N., Mukherjee, P., Ghajar, J., Johnson, C., Kolster, R. A., Sarkar, R., ... & McCandliss, B. D. (2008). Extent of microstructural white matter injury in postconcussive syndrome correlates with impaired cognitive reaction time: a 3T diffusion tensor imaging study of mild traumatic brain injury. *American Journal of Neuroradiology*, 29(5), 967-973.
- Niquet, J., Allen, S. G., Baldwin, R. A., & Wasterlain, C. G. (2004). Evidence of caspase-3 activation in hyposmotic stress-induced necrosis. *Neuroscience letters*, 356(3), 225-227.
- Oberheim, N. A., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. In *Astrocytes* (pp. 23-45). Humana Press.
- O'Meara, R. W., Michalski, J. P., & Kothary, R. (2010). Integrin signaling in oligodendrocytes and its importance in CNS myelination. *Journal of signal transduction*, 2011.
- Ommaya, A. K., & Gennarelli, T. A. (1974). Cerebral concussion and traumatic unconsciousness: correlation of experimental and clinical observations on blunt head injuries. *Brain*, 97(4), 633-654.
- Park, C. O., & Yi, H. G. (2001). Apoptotic change and NOS activity in the experimental animal diffuse axonal injury model. *Yonsei medical journal*, 42(5), 518-526.
- Parrish, A. B., Freel, C. D., & Kornbluth, S. (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(6), a008672.
- Paxinos, G. (Ed.). (2004). *The rat nervous system*. Gulf Professional Publishing.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6th ed.). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Payne, R. S., Schurr, A., & Rigor, B. M. (1996). Cell swelling exacerbates hypoxic neuronal damage in rat hippocampal slices. *Brain research*, 723(1), 210-213.
- Peterson, S. L., & Albertson, T. E. (Eds.). (1998). *Neuropharmacology methods in epilepsy research*. CRC Press.

- Pineda, J. A., Wang, K. K., & Hayes, R. L. (2004). Biomarkers of proteolytic damage following traumatic brain injury. *Brain Pathology*, 14(2), 202-209.
- Povlishock, J. T., & Christman, C. W. (1995). The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans: a review of current thoughts. *Journal of neurotrauma*, 12(4), 555-564.
- Povlishock, J. T., Marmarou, A., McIntosh, T., Trojanowski, J. Q., & Moroi, J. (1997). Impact acceleration injury in the rat: evidence for focal axolemmal change and related neurofilament sidearm alteration. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 56(4), 347-359.
- Prieto, R., Gutiérrez-González, R., Barcia, J. A., Pascual, J. M., Roda, J. M., Cerdán, S., & Matias-Guiu, J. (2009). Modelos experimentales de traumatismo craneoencefálico. *Neurocirugía*, 20(3), 225-244.
- Qin, L., Wu, X., Block, M., Liu, Y. & Breese, G. (2007). Systemic LPS Causes Chronic Neuroinflammation and Progressive Neurodegeneration. *Glia* 55, 453–462
- Raghupathi, R. (2004). Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain pathology*, 14(2), 215-222.
- Raghupathi, R., Graham, D. I., & McIntosh, T. K. (2000). Apoptosis after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*, 17(10), 927-938.
- Rambani, K., Vukasinovic, J., Glezer, A., & Potter, S. M. (2009). Culturing thick brain slices: an interstitial 3D microperfusion system for enhanced viability. *Journal of neuroscience methods*, 180(2), 243-254.
- Riascos, D. (2007). Progresión temporal de los cambios agudos de la cito y dendroarquitectura en tajadas de neocorteza derivada de contusión cerebral de humano (tesis de maestría). Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Riascos, D., Buriticá, E., Jiménez, E., Castro, O., Guzmán, F., Palacios, M., Garcia-Cairasco, N., Geula, C., Escobar, M., & Pimienta, H. (2013). Neurodegenerative Diversity in human cortical contusion: Histological analysis of tissue derived from decompressive craniectomy. *Brain research*, 1537, 86-99.
- Riascos, D., Guzmán, F., Buriticá, E., Palacios, M., Escobar, M. I., & Pimienta, H. (2008). Caracterización de un modelo organotípico de cultivos de neuronas corticales de humano derivadas de trauma craneoencefálico. *Colombia Médica*, 39.
- Reeves, T. M., Kao, C. Q., Phillips, L. L., Bullock, M. R., & Povlishock, J. T. (2000). Presynaptic excitability changes following traumatic brain injury in the rat. *Journal of neuroscience research*, 60(3), 370-379.

Reid, K. H., Edmonds, H. L., Schurr, A., Tseng, M. T. & West, C. A. (1988). Pitfalls in the use of brain slices. *Prog. Neurobiol.* 31, 1–18.

Rubin, R., Strayer, D. S., & Rubin, E. (Eds.). (2008). *Rubin's pathology: clinicopathologic foundations of medicine*. Lippincott Williams & Wilkins.

Runnerstam, M., Bao, F., Huang, Y., Shi, J., Gutierrez, E., Hamberger, A., & Haglid, K. (2001). A new model for diffuse brain injury by rotational acceleration: II. Effects on extracellular glutamate, intracranial pressure, and neuronal apoptosis. *Journal of neurotrauma*, 18(3), 259-273.

Sabri, M., Kawashima, A., Ai, J., & Macdonald, R. L. (2008). Neuronal and astrocytic apoptosis after subarachnoid hemorrhage: a possible cause for poor prognosis. *Brain research*, 1238, 163-171.

Sahara, S., Yanagawa, Y., O'Leary, D. D., & Stevens, C. F. (2012). The fraction of cortical GABAergic neurons is constant from near the start of cortical neurogenesis to adulthood. *The Journal of Neuroscience*, 32(14), 4755-4761.

Salvesen, G. S. (2002). Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death Differ*, 9(1), 3–5.

Santhakumar, V., Ratzliff, A. D., Jeng, J., Toth, Z., & Soltesz, I. (2001). Long-term hyperexcitability in the hippocampus after experimental head trauma. *Annals of neurology*, 50(6), 708-717.

Sarnat, H. B., Nochlin, D., & Born, D. E. (1998). Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system. *Brain and Development*, 20(2), 88-94.

Schmidt-Kastner, R., Robertson, G. S., Hakim, A. (1995). Monoclonal antibody to NeuN as specific marker for neurons in immunohistochemical evaluation of global ischemic damage in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 15(Suppl. 1):S230.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S., & Peter, M. E. (1998). Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*, 254, 439–459.

Schurr, A., Payne, R., Heine, M. & Rigor, B. (1995). Hypoxia, excitotoxicity, and neuroprotection in hippocampal slice preparation. *J. Neurosci. Methods* 59,129–138.

Schurr, A., Reid, K. & Tseng, M. (1985). A Dual chamber for comparative studies using the brain slice preparation. *Comp. Biochem. Physiol* 82, 701–704.

- Schwarzbach, E., Bonislawski, D. P., Xiong, G., & Cohen, A. S. (2006). Mechanisms underlying the inability to induce area CA1 LTP in the mouse after traumatic brain injury. *Hippocampus*, 16(6), 541-550.
- Singleton, R. H., & Povlishock, J. T. (2004). Identification and characterization of heterogeneous neuronal injury and death in regions of diffuse brain injury: evidence for multiple independent injury phenotypes. *The Journal of neuroscience*, 24(14), 3543-3553.
- Singleton, R. H., Zhu, J., Stone, J. R., & Povlishock, J. T. (2002). Traumatically induced axotomy adjacent to the soma does not result in acute neuronal death. *The Journal of neuroscience*, 22(3), 791-802.
- Sloviter, R. S., Sollas, A. L., Barbaro, N. M., & Laxer, K. D. (1991). Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 308, 381–396.
- Smith, D. H., Chen, X. H., Xu, B. N., McIntosh, T. K., Gennarelli, T. A., & Meaney, D. F. (1997). Characterization of diffuse axonal pathology and selective hippocampal damage following inertial brain trauma in the pig. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 56(7), 822-834.
- Stoppini, L., Buchs, P. A., & Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of neuroscience methods*, 37(2), 173-182.
- Sun, K., Xie, X., Liu, Y., Han, Z., Zhao, X., Cai, N., Zhang, S., Song, J., & Wei, L. (2013). Autophagy lessens ischemic liver injury by reducing oxidative damage. *Cell Biosci*, 3, 26.
- Tasdemir, E., Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Criollo, A., Vitale, I., Hangen, E., Modjtahedi, N., & Kroemer, G. (2008). Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. In *Autophagosome and Phagosome* (pp. 29-76). Humana Press.
- Tippett, L. J., Waldvogel, H. J., Thomas, S. J., Hogg, V. M., van Roon-Mom, W., Synek, B. J., Graybiel, A., & Faull, R. L. (2007). Striosomes and mood dysfunction in Huntington's disease. *Brain*, 130(1), 206-221.
- Toth K, Freund TF (1992) Calbindin D28k-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience* 49,793-805.
- Toth, Z., Hollrigel, G. S., Gorcs, T., & Soltesz, I. (1997). Instantaneous perturbation of dentate interneuronal networks by a pressure wave-transient delivered to the neocortex. *The Journal of neuroscience*, 17(21), 8106-8117.
- Tran, L. D., Lifshitz, J., Witgen, B. M., Schwarzbach, E., Cohen, A. S., & Grady, M. S. (2006). Response of the contralateral hippocampus to lateral fluid percussion brain injury. *Journal of neurotrauma*, 23(9), 1330-1342.

- Tzeng, T. T., Tsay, H. J., Chang, L., Hsu, C. L., Lai, T. H., Huang, F. L., & Shiao, Y. J. (2013). Caspase 3 involves in neuroplasticity, microglial activation and neurogenesis in the mice hippocampus after intracerebral injection of kainic acid. *Journal of biomedical science*, 20(1), 90.
- Ünal-Çevik, I., Kılınç, M., Gürsoy-Özdemir, Y., Gurer, G., & Dalkara, T. (2004). Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain research*, 1015(1), 169-174.
- Valverde, F. (2002). Estructura de la corteza cerebral. Organización intrínseca y análisis comparativo del neocortex. *Rev Neurol*, 34(8), 758-780.
- Vereczki, V., Martin, E., Rosenthal, R. E., Hof, P. R., Hoffman, G. E., & Fiskum, G. (2006). Normoxic resuscitation after cardiac arrest protects against hippocampal oxidative stress, metabolic dysfunction, and neuronal death. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26(6), 821-835.
- Verkhatsky, A., & Butt, A. M. (2007). *Glial neurobiology*. John Wiley & Sons.
- Viana, L. C., Lima, C. M., Oliveira, M. A., Borges, R. P., Cardoso, T. T., Almeida, I. N. F., & Picanço-Diniz, C. W. (2013). Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: stereological analysis and three dimensional morphometry. *Neuroscience*, 238, 280-296.
- Voigt, G. E., Löwenhielm, C. P., & Ljung, C. B. (1977). Rotational cerebral injuries near the superior margin of the brain. *Acta neuropathologica*, 39(3), 201-209.
- Wagenmakers, E. J. (2007). A practical solution to the pervasive problems of p values. *Psychonomic bulletin & review*, 14(5), 779-804.
- Wang, M., Iliff, J. J., Liao, Y., Chen, M. J., Shinseki, M. S., Venkataraman, A., ... & Nedergaard, M. (2012). Cognitive deficits and delayed neuronal loss in a mouse model of multiple microinfarcts. *The Journal of Neuroscience*, 32(50), 17948-17960.
- Wendykier, P. (2009). Parallel spectral deconvolution 1.9 User guide. Retrieved from <https://sites.google.com/site/piotrwendykier/software/deconvolution/parallelspectraldeconvolution>
- Weyer, A., & Schilling, K. (2003). Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *Journal of neuroscience research*, 73(3), 400-409.
- Whiteside, G., & Munglani, R. (1998). TUNEL, Hoechst and immunohistochemistry triple-labelling: an improved method for detection of apoptosis in tissue sections—an update. *Brain Research Protocols*, 3(1), 52-53.

- Witgen, B. M., Lifshitz, J., Smith, M. L., Schwarzbach, E., Liang, S. L., Grady, M. S., & Cohen, A. S. (2005). Regional hippocampal alteration associated with cognitive deficit following experimental brain injury: a systems, network and cellular evaluation. *Neuroscience*, 133(1), 1-15.
- X Sureda, F., Junyent, F., Verdaguer, E., AuDAlell, C., Pelegri, C., Vilaplana, J., Folch, J., Canudas, A. M., Zarate, C. B., Pallas, M., & Camins, A. (2011). Antiapoptotic drugs: a therapeutic strategy for the prevention of neurodegenerative diseases. *Current pharmaceutical design*, 17(3), 230-245.
- Xiong, Y., Mahmood, A., & Chopp, M. (2013). Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(2), 128-142.
- Xu, G. P., Dave, K. R., Vivero, R., Schmidt-Kastner, R., Sick, T. J., & Pérez-Pinzón, M. A. (2002). Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. *Brain research*, 952(2), 153-158.
- Yakovlev, A. G., Knoblach, S. M., Fan, L., Fox, G. B., Goodnight, R., & Faden, A. I. (1997). Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *the Journal of Neuroscience*, 17(19), 7415-7424.
- Yakovlev, A. G., Ota, K., Wang, G., Movsesyan, V., Bao, W. L., Yoshihara, K., & Faden, A. I. (2001). Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury. *The Journal of Neuroscience*, 21(19), 7439-7446.
- Yu, W., & Lu, B. (2012). Synapses and dendritic spines as pathogenic targets in Alzheimer's disease. *Neural plasticity*, 2012.
- Zhang, J., Yoganandan, N., Pintar, F. A., & Gennarelli, T. A. (2006). Role of translational and rotational accelerations on brain strain in lateral head impact. *Biomed Sci Instrum*, 42, 501-506.
- Zhang, Y., Pan, C., Wu, X., Dong, Y., Culley, D., Crosby, G., Li, T., & Xie, Z. (2014). Different effects of anesthetic isoflurane on caspase-3 activation and cytosol cytochrome c levels between mice neural progenitor cells and neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(14).
- Zhao, M., Choi, Y. S., Obrietan, K., & Dudek, S. M. (2007). Synaptic plasticity (and the lack thereof) in hippocampal CA2 neurons. *The Journal of Neuroscience*, 27(44), 12025-12032.
- Zhao, Y., Luo, P., Guo, Q., Li, S., Zhang, L., Zhao, M., & Fei, Z. (2012). Interactions between SIRT1 and MAPK/ERK regulate neuronal apoptosis induced by traumatic brain injury in vitro and in vivo. *Experimental neurology*, 237(2), 489-498.